

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

IMPLICACION DE LOS GENES *CDC15* Y *NPK1* EN EL FENOTIPO
AUTOLITICO *Lyt1* DE *Saccharomyces cerevisiae* Y AISLAMIENTO DE
DOS GENES HETEROLOGOS SUPRESORES.

MARIA YUSTE ROJAS

Madrid, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II

IMPLICACION DE LOS GENES *CDC15* Y *NPK 1* EN EL FENOTIPO
AUTOLITICO *Lyt 1* DE *Saccharomyces cerevisiae* Y
AISLAMIENTO DE DOS GENES HETEROLOGOS SUPRESORES.

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Farmacia

Por, MARIA YUSTE ROJAS

Directores, Dr. MIGUEL SANCHEZ PEREZ
Dr. CESAR NOMBELA CANO

Madrid, 1995

CESAR NOMBELA CANO, CATEDRATICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II DE LA FACULTAD DE
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que Dña. MARIA YUSTE ROJAS ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Miguel Sánchez Pérez y del Dr. César Nombela Cano, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título:
"Implicación de los genes *CDC15* y *NPK1* en el fenotipo autolítico *Lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae* y aislamiento de dos genes heterólogos supresores".

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, a 3 de Mayo de 1995.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'César Nombela Cano', with a stylized flourish at the end.

Fdo: Prof. Dr. César Nombela Cano

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la Formación del Personal Investigador.

"Knowledge is power"

F. Bacon

"Knowledge is power, knowledge is safety, knowledge is happiness"

T. Jefferson

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera podido llegar a buen fin sin la ayuda inestimable de una serie de personas a las que me gustaría expresar mi agradecimiento.

En primer lugar al Dr. César Nombela, por haberme permitido realizar este proyecto en el Departamento.

Al Dr. Miguel Sánchez, por haber dirigido esta tesis doctoral. Por sus consejos, orientaciones e ideas.

To the Cross's lab: Fred & Liz, Ben & Martha, Liz Vallen, Arthur, Kristi, Bert, Maarten, Isabel, Ana, Dan L., Steve and Kim. For showing me that research can be something else, for being my friends and treating me as their family. Thanks to you all I am happily going to follow this track. Thanks a lot!

To all the people and friends that have listened, helped and advised me at the Rockefeller University (specially in the early years: Dr. Rubén Henríquez and Dr. Clay Reid). To Dan Schwartz, for being there supporting me this past year. To Dr. Koller, for his unselfish help and friendship from Switzerland.

Al "club social" departamental: José, Isabel, Alberto, Amalia, Miguel, Alejandra, Antonia, Mada y Alicia. Por haberme "aguantado" y escuchado durante estos largos cuatro años.

A todas las personas implicadas en el *lyt 1*, especialmente a Ramiro Revuelta y a Javier Jiménez, que trabajaron directamente conmigo "para bien o para mal", y a los que intenté pasar el testigo científico.

A los "chicos" de la Unidad 3, por los buenos ratos (porque en el fondo son los que quedan). A la hora de la verdad, les voy a echar un montón de menos a todos.

A todas la demás gente que está y estuvo trabajando en este Departamento; procariotas, levaduros y eucariotas superiores. Gracias por haberme facilitado la realización de este trabajo.

Al personal personal auxiliar del Departamento; especialmente a Benito de la Calle, que todas las mañanas siempre supo arrancarme una sonrisa, por su ayuda siempre cordial y sin pedir explicaciones.

Por supuesto, a mi familia, que siempre me ha apoyado incondicionalmente y ha confiado siempre en mí y en mis posibilidades. Ellos fueron el motor que me impulsó a seguir adelante en los momentos más difíciles y duros en los que estuve a punto de tirar la toalla.

ABREVIATURAS

2n:	Diploide
4n:	Tetrahaploide
A:	Absorbancia
DNA:	Acido desoxirribonucleico
Amp:	Ampicilina
AMPc:	Adenosin monofosfato ciclico
aprox:	Aproximado
RNA:	Acido ribonucleico
mRNA:	Acido ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosin trifosfato
CHX:	Cicloheximida
CIAP:	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
Clbs:	Ciclinas mitoticas
Clns:	Ciclinas N
cpm:	Cuentas por minuto
DMSO:	Dimetil-sulfoxido
DO:	Densidad optica
E:	Eritromicina
EDTA:	Acido etilen-diamino tetraacetico
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory
<i>et al.</i> :	Y colaboradores
EtBr:	Bromuro de etidio
GAPs	Proteinas Activadoras de GTPasas
GDP:	Guanosin difosfato
GTP:	Guanosin trifosfato
IP:	Ioduro de propidio
IPTG:	Isopropil-tiogalactosido
Kb:	Kilobases

Kd:	Kilodalton
l:	Litro
M:	Molar
MBC:	<i>Benomil</i>
MCS:	Sitio de clonación multiple
mg:	Miligramos
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
n:	Haploide
nm:	Nanómetros
ORF:	Marco abierto de lectura
ORI:	Origen de replicación
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salina
PEG:	<i>Polietilén glicol</i>
RNAse:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato sódico
TE:	Tampón Tris-EDTA
Tpks:	Proteín-quinasas dependientes de AMPc
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
UE:	Unidades enzimáticas
v/v:	Volúmen/Volúmen
X-gal:	5-bromo-4-cloro3-indolil- β -D-galactopiranósido
°C:	Grados centígrados
μ g:	Microgramos
Δ :	Deleción

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
Genes que afectan al ciclo celular que se citan en este trabajo	2
1.- CICLO BIOLOGICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.1.- Ciclo mitótico	7
1.1.1.- Cdc28p, una proteína-quinasa esencial	9
1.1.2.- Ciclinas G1	11
1.1.3.- Factores de transcripción reguladores del punto "START"	11
1.1.4.- Ciclinas mitóticas	13
1.1.5.- Dinámica de las ciclinas	14
1.2.- Apareamiento	14
1.3.- Ciclo meiótico	16
2.- LA RESPUESTA A NUTRIENTES MEDIADA POR LA VIA Ras-AMPc	19
3.- MORFOGENESIS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.1.1.- Establecimiento de la polaridad	21
3.1.2.- Elección de la orientación de un eje para la polaridad celular	24
3.1.3.- El ciclo de la GTPasa Bud1p	24
3.1.4.- Polaridad durante el apareamiento	25
4.- CONCEPTO DE INTEGRIDAD Y AUTOLISIS	25
II.- MATERIALES Y METODOS	27
1.- MICROORGANISMOS Y MATERIAL GENICO UTILIZADOS	28
1.1.- Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.2.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	28
1.3.- Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	28
1.4.- Plásmidos	28
1.5.- Genotecas	28
1.5.1.- Genoteca genómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.5.2.- Genoteca de cDNA de <i>S. pombe</i>	28
1.5.3.- Genoteca de cDNA humana	28
2.- MEDIOS DE CULTIVO	28
2.1.- Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.- Medios de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.3.- Medios de cultivo de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	32
3.- MANIPULACION DE MICROORGANISMOS	33
3.1.- Condiciones de crecimiento y manipulación de cepas	33
3.1.1.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	33
3.1.2.- Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.2.- Determinación del crecimiento	33
3.2.1.- Turbidimetría	33
3.2.2.- Recuento de células	33
3.3.- Determinación del porcentaje de viables de un cultivo	33
3.3.1.- Por citometría de flujo	33
3.3.2.- Por microscopía	34
3.3.3.- Por valoración cualitativa de fosfatasa alcalina	34
3.4.- Técnicas de microscopía	34
3.4.1.- Microscopía de contraste de fases	34
3.5.- Tinción de núcleos	34
3.6.- Técnicas genéticas	34
3.6.1.- Obtención de diploides	34

3.6.2.- Esporulación	35
3.6.3.- Disección de ascas	35
3.7.- Análisis del ciclo celular	35
3.8.- Determinación de la fosforilación oxidativa	35
4.- MANIPULACION DE DNA. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	35
4.1.- Tampones utilizados	35
4.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	35
4.3.- Aislamiento de DNA total de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.4.- Aislamiento de RNA total de levaduras	36
4.5.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	36
4.6.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	36
4.7.- Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA/RNA	36
4.8.- Digestión del DNA con endonucleasas	37
4.9.- Desfosfatización del extremo 5' del DNA	37
4.10.- Ligación del DNA	37
4.11.- Transformación del DNA	37
4.12.- Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA	37
4.13.- Hibridación DNA-DNA	38
4.13.1.- Transferencia del DNA a una membrana de nylon	38
4.14.- Hibridación RNA-DNA, técnica de "Northern"	38
4.14.1.- Transferencia del RNA a una membrana de nylon	38
III.- RESULTADOS	39
OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO	40
1.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA MUTANTE <i>lyt 1</i>	40
1.1.- Localización del punto de parada de la cepa <i>lyt 1</i> en el ciclo celular	40
1.1.1.- Crecimiento en hidrox urea	40
1.1.2.- Crecimiento en benomil (MBC)	40
1.1.3.- Tinción de núcleos	43
1.1.4.- Ciclo celular	43
1.2.- El proceso de autólisis depende de una síntesis activa de proteínas	43
1.2.1.- Crecimiento de la estirpe mutante <i>lyt 1</i> en fuentes de carbono distintas de glucosa	43
1.2.2.- Crecimiento de la estirpe mutante <i>lyt 1</i> en eritromicina	47
1.2.3.- Determinación con 2,3,5-trifeniltetraazolio de la actividad mitocondrial en la cepa L2C24d	47
1.2.4.- Crecimiento de la cepa <i>lyt 1</i> en presencia de cicloheximida	47
1.3.- Estudio del punto de gemación de la estirpe mutante <i>lyt 1</i>	47
1.4.- Estudio del defecto meiótico del diploide homocigótico <i>lyt 1/lyt 1</i>	51
2.- CLONACIÓN DEL GEN ESTRUCTURAL RESPONSABLE DEL FENOTIPO <i>Lyt 1</i>	51
2.1.- Estudio de los insertos que portaban los transformantes aislados	51

2.2.- Caracterización fenotípica de las estirpes transformantes T2 y T7	51
2.2.1.- Crecimiento a 24°C y a 37°C	51
2.2.2.- Morfología celular al microscopio de contraste de fases	55
2.2.3.- Esporulación	55
2.3.- Caracterización de los fragmentos T2 y T7 capaces de complementar la mutación <i>lyt 1</i>	55
2.3.1.- Determinación del tamaño, mapa de restricción de ambos fragmentos	55
2.3.2.- Determinación del mínimo fragmento del plásmido T7 capaz de complementar la mutación <i>lyt 1</i>	55
2.3.3.- Determinación del mínimo fragmento del plásmido T2 capaz de complementar la mutación <i>lyt 1</i>	57
2.3.4.- Secuenciación de los fragmentos T2X2 y T7N1X3. Secuenciación del fragmento interno <i>XhoI</i> - <i>XhoI</i> del plásmido T7N1X1	57
2.3.5.- Hibridación de <i>CDC15</i> con T7 y T2	57
2.4.- ¿ <i>CDC15</i> y <i>NPK1</i> responsables del fenotipo <i>Lyt 1</i> ?	57
2.4.1.- Estudio del fenotipo de la estirpe diploide heterocigótico <i>cdc15/lyt 1</i>	57
2.4.2.- Estudio fenotípico de la cepa L2C24d (haploide <i>lyt 1</i>) transformada con el gen <i>CDC15</i>	60
2.4.3.- Estudio fenotípico de la cepa DU3 (diploide homocigótico <i>lyt 1/lyt 1</i>) transformada con el gen <i>NPK1</i>	60
2.4.4.- Estudio del nivel de expresión de los genes <i>CDC15</i> y <i>NPK1</i> en una cepa mutante <i>lyt 1</i>	60
2.5.- RESCATE ALELICO DEL GEN <i>CDC15</i> DE LA CEPA MUTANTE <i>lyt 1</i>	63
2.5.1.- Estudio de la lisis y esporulación del diploide heterocigótico <i>cdc15(lyt 1)/CDC15</i> (integrado en un fondo <i>lyt 1</i>)	63
2.6.- RESCATE ALELICO DEL GEN <i>NPK1</i> DE LA ESTIRPE MUTANTE <i>lyt 1</i>	63
2.6.1.- Estudio de la lisis y esporulación del diploide heterocigótico <i>npk1(lyt 1)/NPK1</i> (integrado en un fondo <i>lyt 1</i>)	67
3.- CARACTERIZACIÓN DE GENES HETEROLOGOS SUPRESORES DEL FENOTIPO <i>Lyt 1</i>	70
3.1.- CLONACIÓN DEL GEN <i>slt 1</i> (<i>Schizosaccharomyces Lyt 1</i>) DE <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	70
3.1.1.- Caracterización del fenotipo conferido a la cepa mutante <i>lyt 1</i> por TS1	70
3.1.2.- Secuenciación del gen <i>slt 1</i>	70
3.1.3.- Estudio de la expresión de <i>slt 1</i>	70
3.2.- CLONACIÓN DEL GEN <i>HLT1</i> (<i>Humano Lyt 1</i>) DE <i>Homo sapiens</i>	75
3.2.1.- Caracterización del transformante <i>lyt 1</i> -TH	75
3.2.2.- Secuenciación del gen <i>HLT1</i>	75
4.- INTERACCIÓN DEL <i>Lyt1</i> CON OTROS GENES RELACIONADOS	77
4.1.- RELACIÓN CON <i>Dbf2p</i>	77

4.1.1.- Estudio fenotípico del diploide MY40 (<i>lyt1/dbf2</i> heterozigótico)	77
4.1.2.- Estudio fenotípico de la estirpe mutante <i>dbf2-1</i> transformada con los genes relacionados descritos en este trabajo	77
4.2.- RELACION <i>CDC15/SPO12</i>	77
III.- DISCUSION	81
1.- ANALISIS DE LAS CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LA ESTIRPE <i>lyt1</i> , UN MUTANTE α DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
1.1.- LA CEPA <i>lyt1</i> ES UN MUTANTE α	82
1.2.- LA INTEGRIDAD CELULAR DEPENDE DE UNA SINTESIS ACTIVA DE PROTEINAS	83
1.3.- EL CICLO MEIOTICO SE DETIENE TRAS LA MEIOSIS I	84
1.4.- EXISTE UN DEFECTO, A 37°C, EN LA ELECCION DEL PATRON DE GEMACION EN CELULAS HAPLOIDES	84
2.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS GENES RESPONSABLES DEL FENOTIPO <i>Lyt1</i>	85
2.1.- ESTUDIO DEL <i>Lyt1</i> EN RELACION CON OTROS GENES Y MUTACIONES	88
3.- ESTUDIO DE DOS GENES HETEROLOGOS CAPACES DE COMPLEMENTAR EL DEFECTO DE ESPORULACION <i>Lyt1</i>	89
3.1.- <i>slt1</i> DE <i>Schizosaccharomyces cerevisiae</i>	89
3.2.- <i>HLT1</i> HUMANO	90
IV.- CONCLUSIONES	92
V.- BIBLIOGRAFIA	94

INTRODUCCION

GENES QUE AFECTAN AL CICLO CELULAR QUE SE CITAN EN ESTE TRABAJO

GENES CDC

<i>CDC3</i> <i>CDC10</i> <i>CDC11</i> <i>CDC12</i>	Forman una familia de genes cuyos productos son necesarios para el ensamblaje de un anillo de filamentos de 10nm en la unión entre la célula madre y la hija. Una mutación termosensible en cualquiera de ellos impide la citoquinesis.
<i>CDC15</i>	Codifica una proteína-quinasa. Su mutación impide la mitosis. En el momento de la parada, el citoesqueleto está alargado y los núcleos separados.
<i>CDC24</i>	También llamado <i>CLS4</i> . Codifica una proteína de unión a calcio. Interacciona genéticamente con <i>CDC42</i> y con genes implicados en el patrón de gemación. Su mutación impide la gemación.
<i>CDC25</i>	Codifica una proteína de intercambio de nucleótidos que actúa sobre Ras. Su defecto para el ciclo celular antes de START e impide el crecimiento de los mutantes.
<i>CDC28</i>	Codifica una proteína-quinasa que se asocia con ciclinas. Esencial para START y mitosis. Es requerida para la entrada en Meiosis I, aunque no para la síntesis de DNA premeiótica. Su defecto detiene el ciclo preferentemente en el punto START.
<i>CDC31</i>	Codifica una proteína de unión a calcio, de pequeño tamaño, cuya actividad se requiere para la duplicación del cuerpo polar del huso.
<i>CDC35</i>	También llamado <i>CYR1</i> . Codifica la adenilato ciclasa. Su defecto detiene el ciclo celular antes de START e impide el crecimiento de los mutantes. $\Delta cdc35$ prolifera aunque muy despacio.
<i>CDC42</i>	Codifica una proteína G de bajo peso molecular. Interacciona con <i>CDC24</i> , <i>CDC43</i> y otros genes implicados en la selección del patrón de gemación. Su mutación impide la gemación, aunque otros aspectos del ciclo son normales.
<i>CDC43</i>	Codifica la subunidad β de la prenil-transferasa que modifica a Cdc42p. Interacciona genéticamente con <i>CDC42</i> y otros genes implicados en el patrón de gemación. Su mutación impide la gemación aunque otros aspectos del ciclo son normales.

REGULADORES DE Cdc28p

<i>CLN1</i> <i>CLN2</i>	Codifican dos ciclinas G1, altamente relacionadas. Su mRNA fluctúa durante el ciclo alcanzando un máximo en el punto START.
<i>CLN3</i>	También llamado <i>DAF1</i> y <i>WHI1</i> . Codifica una ciclina G1 esencial para la regulación del tamaño celular en el punto START. Activa la transcripción de las restantes ciclinas G1.

<i>HCS26</i>	Codifica una posible ciclina G1. Interacciona con <i>SWI4</i> , aunque no con las demás <i>CLNs</i> .
<i>CLB1</i> <i>CLB2</i> <i>CLB3</i> <i>CLB4</i>	Codifican las ciclinas mitóticas. El defecto de los cuatro genes causa células capaces de pasar por START, gemar y sintetizar DNA aunque incapaces de ensamblar el citoesqueleto y de proceder a la mitosis.
<i>CLB5</i> <i>CLB6</i>	Codifican una pareja de ciclinas B cuya función es la inducción de la síntesis de DNA.
<i>SWI4</i>	Codifica la subunidad de unión a DNA del factor de transcripción SBF, que induce la transcripción de <i>CLN1</i> y <i>CLN2</i> .
<i>MBP1</i>	Codifica la subunidad de unión a DNA del factor de transcripción MBF, que induce la transcripción de <i>CLB5</i> , <i>CLB6</i> y genes responsables de la replicación del DNA.
<i>SWI6</i>	Codifica un activador transcripcional que se asocia con <i>SWI4</i> para formar SBF y con <i>MBP1</i> para formar MBF.

AMPc Y CONTROL DEL CRECIMIENTO

<i>TPK1</i> <i>TPK2</i> <i>TPK3</i>	Codifican tres subunidades catalíticas de tres proteínas-quinasas, homologas entre sí, dependientes de AMPc. La delección simultánea de los tres es letal
<i>RAS1</i> <i>RAS2</i>	Codifican dos proteínas Ras altamente relacionadas. La delección de ambas es letal. Su activación previene la meiosis y la fase G ₀ .
<i>IRA1</i> <i>IRA2</i>	Codifican dos GTPasas que estimulan la hidrólisis de GTP por Ras. Su mutación previene la meiosis, la fase G ₀ y suprime $\Delta cdc25$.

QUINASAS Y FOSFATASAS

<i>CMD1</i>	Codifica la calmodulina. Esencial. Su defecto provoca una gemación ralentizada y la muerte en la mitosis.
<i>DBF2</i>	Codifica una proteína-quinasa. Su mutación retrasa la síntesis de DNA y la parada en mitosis; fenotipo suprimido por Spo12p.
<i>DBF20</i>	Codifica una proteína-quinasa homóloga a Dbf2p. La supresión de ambas es letal.

GEMACION Y CITOESQUELETO DE ACTINA

<i>BUD1</i>	También llamado <i>RSR1</i> . Codifica una proteína G de pequeño tamaño requerida para la elección del patrón de gemación.
-------------	--

<i>BUD2</i>	Codifica una proteína activadora de GTPasas que actúa sobre Bud1p. Requerida para la elección del patrón de gemación.
<i>BUD3</i>	Codifica una proteína localizada en el sitio de gemación de células diploides. Requerida para la elección del patrón de gemación.
<i>BUD4</i>	No está clonado. Requerido para la elección del patrón de gemación.
<i>BUD5</i>	Codifica una proteína con homología a proteínas de intercambio de nucleótidos. Requerida para la elección del patrón de gemación.
<i>BEM1</i>	Codifica una proteína con dominios SH3 (implicados en la interacción con el citoesqueleto de actina). No es esencial, aunque su defecto causa un defecto parcial en la emergencia de la yema. Interacciona genéticamente con <i>BUD5</i> .
<i>SPA2</i>	Clonado pero sin homologías con otros genes conocidos. Se localiza en el sitio de emergencia de la yema.
<i>ABP1</i>	Codifica una proteína con dominios SH3 de unión a actina. No es esencial.
<i>CAP2</i>	Codifica la subunidad β de una proteína de unión a actina.
<i>MYO2</i>	Codifica una miosina. Es esencial. Su mutación provoca la parada del ciclo celular en la emergencia de la yema.

APAREAMIENTO

<i>MATα1</i>	Parte del locus MAT α . Codifica un activador transcripcional que coopera con Mcm1p para inducir genes específicos α .
<i>MATα2</i>	Parte del locus MAT α . Codifica un activador transcripcional que coopera con Mcm1p para reprimir genes específicos α . En células diploides interacciona con Mata1p para reprimir los genes específicos haploides e inducir la esporulación.
<i>MATα1</i>	Parte del locus MAT α .
<i>MCM1</i>	Codifica una proteína de unión a DNA que forma parte de diferentes complejos de transcripción. Esencial. En su defecto ciertos orígenes son incapaces de iniciar la replicación.
<i>HO</i>	Codifica una endonucleasa de restricción que inicia el cambio en el locus MAT. Se expresa conjuntamente con <i>CLN1</i> y <i>CLN2</i> .
<i>SWI5</i>	Codifica un factor de transcripción que actúa activando la expresión de <i>HO</i> . Se sintetiza durante G2, pero su fosforilación (Cdc28p dependiente) impide su entrada al núcleo hasta la anafase.

<i>STE2</i>	Codifica el receptor del factor α . Activa la proteína G de Ste4p.
<i>STE3</i>	Codifica el receptor del factor α . Activa la proteína G de Ste4p.
<i>STE4</i>	Codifica la subunidad β de una proteína G trimérica que interacciona con el receptor del factor sexual.
<i>STE5</i>	Codifica una proteína que sirve como soporte para Ste11p, Ste7p, Fus3p y Kss1p.
<i>STE7</i>	Codifica una MAP quinasa quinasa, fosforilada y activada por Ste11p.
<i>STE11</i>	Codifica una proteína-quinasa homologa a Raf. Se activa por fosforilación.
<i>STE12</i>	Codifica un factor de transcripción requerido para la expresión de genes de transducción de señales y para la parada de ciclo en G1. Activada por fosforilación por Fus3p ó Kss1p.
<i>STE18</i>	Codifica la subunidad γ de una proteína G trimérica que interacciona con el receptor del factor sexual. Responsable, junto con Ste4p, de la activación de la cascada de apareamiento.
<i>SCG1</i>	También llamado <i>GPA1</i> . Codifica la subunidad α de una proteína G trimérica que interacciona con el receptor del factor sexual.
<i>FUS3</i>	También llamado <i>DAC2</i> . Codifica una MAP quinasa. Fosforila y activa a Far1p. Implicado en la modificación de Cln3p inducida por tratamiento con factor sexual. Requerida para la activación de Ste12p.
<i>KSS1</i>	Codifica una MAP quinasa. Requerida para la activación de Ste12p.
<i>FAR1</i>	Clonado pero sin homologías conocidas. $\Delta far1$ inhibe la parada del ciclo celular en presencia de factores sexuales aunque se siguen activando los genes de apareamiento. Se une a Cln1p y a Cln2p y es requerida para la degradación de éstas inducida por factor sexual.

MEIOSIS

<i>SPO12</i>	Clonado pero sin homologías conocidas. Su defecto produce esporas apomíticas (2n), donde algunos cromosomas se segregan como lo harían en la Meiosis I y otros como en la Meiosis II.
<i>SPO13</i>	Sin homologías conocidas. $\Delta spo13$ produce esporas apomíticas por un defecto en la consecución de la Meiosis I. Su sobreexpresión para el ciclo mitótico en G2/M.

- RME1* Codifica un represor de la expresión de *IME1*, que se expresa en células haploides pero no en diploides. Su defecto permite esporular diploides a/a o α/α .
- IME1* Codifica un regulador transcripcional producido en células a/α como respuesta a condiciones nutricionales desfavorables. $\Delta ime1$ no esporulan. Su sobreexpresión permite esporular diploides a/a o α/α .

Introducción

El ciclo celular es la secuencia de procesos por los cuales una célula se divide para dar lugar a dos células idénticas. Sin comprender este "simple" hecho de la Biología, nunca podremos entender cómo a partir de una célula sencilla, como puede ser un espermatozoide y un óvulo, se produce un ser humano adulto compuesto aproximadamente de 10^{13} células, ni ningún proceso de crecimiento o de diferenciación tisular, ni la multiplicación de seres procariotas o eucariotas unicelulares... Sin conocer los puntos de control que modulan las fases de este proceso, nunca podremos diseñar estrategias efectivas para controlar la multiplicación celular incontrolada que se da en el cáncer.

Gracias a que los mecanismos bioquímicos que rigen el proceso de división celular están conservados filogenéticamente, proteínas humanas pueden suplantar la función, a lo largo del ciclo celular, de proteínas de un organismo tan sencillo como una levadura. Así pues, el uso de técnicas de ingeniería genética y biología molecular en eucariotas unicelulares como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, nos permite clonar genes tanto homólogos como heterólogos para intentar dilucidar los procesos que tienen lugar en otros eucariotas e incluso en células humanas. La importancia de trabajar con una genética interespecífica reside, principalmente, en la obtención de una visión global y generalizada del ciclo celular y no sólo restringida a una especie eucariota.

1.- CICLO BIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

La figura 1 muestra el ciclo biológico de *S. cerevisiae*. En este se distinguen principalmente dos partes. Una correspondiente al ciclo mitótico o asexual y otra que incluye todos los procesos que dan lugar a un cambio de ploidía en la célula (apareamiento y esporulación).

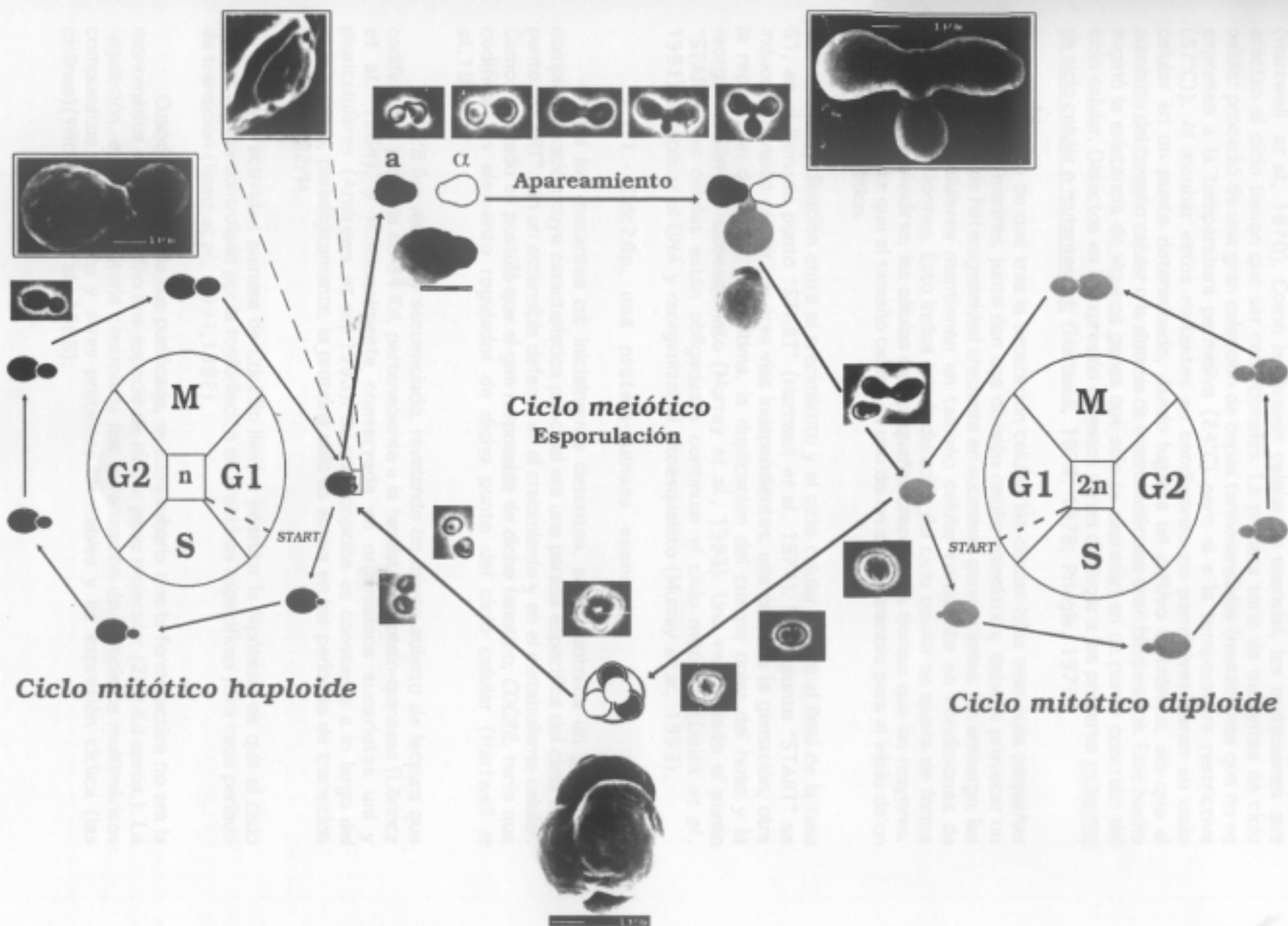
1.1.- Ciclo mitótico.

El ciclo celular de un organismo eucariota se puede dividir principalmente en dos estadios principales: la Interfase (donde el DNA se encuentra, unido a proteínas, distribuido difusamente por el núcleo y los cromosomas son indistinguibles como unidades separadas) y la Mitosis (FASE M) (división de los cromosomas). En ambas fases se diferencian dos tipos de procesos: aquellos que tienen lugar de manera continuada (síntesis de ribosomas, membranas, citoesqueleto, etc.), y aquellos que tienen lugar de una manera puntual; es decir, una sola vez en cada ciclo. La replicación del DNA, o FASE S del ciclo celular, es uno de estos procesos puntuales y está restringida a un período en mitad de la interfase. El intervalo del ciclo entre la mitosis y la fase S se denomina FASE G₁. El que va desde la síntesis del material génico hasta la mitosis se llama FASE G₂ (Murray et al., 1993).

Gracias a que *S. cerevisiae* se divide asimétricamente por gemación, es fácil seguir la evolución del ciclo celular. En los primeros estadios del ciclo, se forma una pequeña yema (justo tras el punto "START" que explicaremos más adelante), que crece de manera continuada para separarse al final de la célula madre. Este hecho permite seguir fácilmente el ciclo, pues el tamaño de la yema es indicativo del punto de división en que se encuentra la célula madre (Murray et al., 1993).

S. cerevisiae difiere de otras células eucariotas no sólo en cómo crece, sino también en cómo organiza la mitosis. Lo más destacable en este sentido es que la membrana nuclear no se desorganiza y que los microtúbulos se concentran en una estructura denominada "cuerpo polar del huso" equivalente funcional, pero no estructuralmente, al centrosoma de eucariotas superiores (Murray et al., 1993).

FIGURA 1: CICLO BIOLÓGICO DE *S. cerevisiae*.



La búsqueda de mutaciones que afectaran el ciclo celular empezó al final de 1960 (Hartwell *et al.*, 1970). Como la división celular es esencial, las mutaciones que afectan al ciclo tienen que ser condicionales. La primera serie de mutantes de ciclo celular procedió de una gran colección de cepas termosensibles (mutaciones que no se expresan a la temperatura permisiva (24°C) pero sí a la temperatura restrictiva (37°C)). Al incubar estos mutantes en condiciones no permisivas paran su ciclo celular en un punto determinado, dando lugar a un cultivo sincrónico, sin que el aumento del tamaño celular o la síntesis de macromoléculas sean bloqueados. Este hecho sugirió la existencia de algunos genes que sólo se expresan en un punto concreto del ciclo celular. Defectos en la expresión de estos genes dió lugar a los primeros mutantes de ciclo celular o mutantes *cdc* (Hartwell, 1974, 1978; Pringle, 1975).

El hecho de que tras la separación celular, las células hijas sean más pequeñas que las células madres, junto con una división celular asimétrica, debería provocar un tamaño celular de heterogeneidad creciente en sucesivas generaciones. Sin embargo, las poblaciones celulares mantienen un tamaño celular constante en condiciones de crecimiento uniformes. Esto indica que la duración del ciclo celular se ajusta de forma que, antes de dividirse, las células más pequeñas crecen más tiempo que las mayores. Este dato sugiere que el tamaño celular es uno de los determinantes para el inicio de un nuevo ciclo mitótico.

La coordinación entre el crecimiento y el ciclo celular ocurre al final de la fase G1, en el llamado punto "START" (Hartwell *et al.*, 1974). En el punto "START" se induce la división celular por tres vías independientes; una provoca la gemación, otra la replicación del DNA, y la última, la duplicación del cuerpo polar del huso y la reorganización del citoesqueleto (Murray *et al.*, 1993). Una vez pasado el punto "START", las células están obligadas a continuar el ciclo mitótico (Dirick *et al.*, 1991), a replicar el DNA y reorganizar el citoesqueleto (Murray *et al.*, 1993).

1.1.1.- Cdc28p, una proteína-quinasa esencial.

Entre los mutantes *cdc* inicialmente descritos, se encontraba un grupo de complementación cuya característica principal era una parada específica del ciclo en el punto "START" con un ostensible defecto en el crecimiento y en el metabolismo celular. Como resultado se postuló que el gen responsable de dicho fenotipo, *CDC28*, tenía que codificar un elemento regulador de dicho punto del ciclo celular (Hartwell *et al.*, 1974).

CDC28 fue aislado y secuenciado, revelando un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 34 Kd, perteneciente a la familia de proteína-quinasas (Lörincz *et al.*, 1984), y funcionalmente conservada en organismos eucariotas uni y pluricelulares (Andrews *et al.*, 1993). Su transcripción es constante a lo largo del ciclo aunque, paradójicamente, la proteína sólo es activa en los periodos de transición "START" y G2/M.

Esta actividad quinasa de Cdc28p llevó a postular la hipótesis de que el ciclo celular estaba controlado por la fosforilación de proteínas específicas para cada periodo de transición (Reed *et al.*, 1991, 1992).

Cuando la proteína fue purificada, se comprobaría que la forma activa no era la monomérica de 34 Kd, sino una especie de mayor peso molecular (200 Kd aprox.). La regulación, entonces, estaría controlada por la formación de complejos multiméricos compuestos por Cdc28p y otras proteínas inestables y de expresión cíclica (las ciclinas) (Wittenberg *et al.*, 1988).

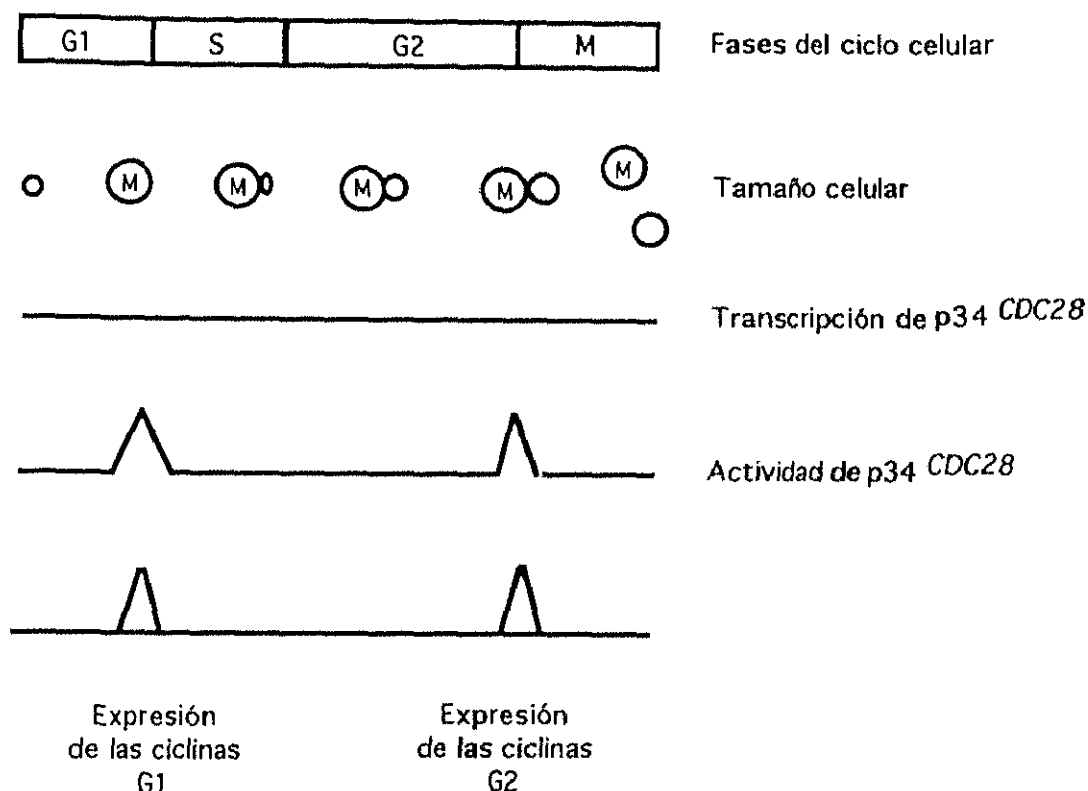


FIGURA 2: PROGRESION EN EL CICLO MITOTICO Y EXPRESION PERIODICA DE GENES EN *S. cerevisiae*.

La transcripción de p34 *CDC28* es constante a lo largo del ciclo, sin embargo la proteína sólo es activa en las transiciones G1/S y G2/M. En esos dos puntos también se activa respectivamente la expresión de las ciclinas G1 (antes de la gemación) y la de las ciclinas G2 (antes de la mitosis). Estos dos hechos son los principales responsables del ciclo mitótico en *Saccharomyces cerevisiae*.

En la transición G1/S, también influye un tamaño celular mínimo. A partir de ese punto, la célula madre emite una yema que crecerá a lo largo del ciclo hasta la citoquinesis. Sin embargo, dicho tamaño no será suficiente para iniciar un nuevo ciclo, por lo que la célula hija entrará en un periodo en que crecerá hasta alcanzar el tamaño mínimo.

En *S. cerevisiae*, las ciclinas están presentes en los puntos de transición, "START" y G2/M, tras breves períodos de transcripción de sus genes estructurales. Esta expresión periódica, regulada por el ciclo celular, es fundamental para que las células puedan pasar los puntos de control existentes entre las diferentes fases del ciclo (Figura 2)(Johnston *et al.*, 1992).

1.1.2.- Ciclinas G1.

Todo lo que sabemos hoy en día sobre la función de las ciclinas no mitóticas, está basado principalmente en el conocimiento de las de *S. cerevisiae*.

Hasta ahora "tres ciclinas N", *CLN1*, *CLN2* y *CLN3*, han sido identificadas en diversos estudios (Cross, 1988; Hadwiger *et al.*, 1989; Nash *et al.*, 1988). Cuando los tres genes *Cln* son inactivos, las células detienen su ciclo en la fase G1. Cualquiera de estos tres genes es capaz de restaurar la capacidad proliferativa de la célula, aunque la capacidad de regular el tamaño celular no se restituya totalmente.

Las secuencias aminoacídicas de *Cln1p* y *Cln2p* tienen un alto grado de homología entre sí, mientras que *Cln3p* difiere en cuanto a homología. Sin embargo, todas mantienen una semejanza residual: la zona limitada al dominio de activación de las CDKs o quinasas dependientes de ciclinas (p.e: *Cdc28p*) (Lew *et al.*, 1992).

Los niveles de mRNA de *Cln1* y *Cln2* fluctúan durante el ciclo con un máximo al final de la fase G1, mientras que los de *Cln3* permanecen constantes (Figura 3) (Lew *et al.*, 1992).

La degradación de las *Clnp* se produce vía ubiquitinación (Glutzer *et al.*, 1991) mediada por *Cdc34p* (*Ubc3*) (Yaglom *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995). El hecho de que la delección del fragmento carboxilo terminal de *Cln3p* (Región PEST) le confiera estabilidad, sugiere que la señal de ubiquitinación de las *Clns* está en este extremo de la proteína (Cross, 1988; Yaglom *et al.*, 1995). Para que *Cln3p* pueda ser ubiquitinada, la región PEST ha de ser fosforilada por *Cdc28p* (Yaglom *et al.*, 1995).

HCS26 fue aislado como supresor multicopia de una mutación en el gen que codifica el factor de transcripción *Swi4*. Es una proteína de expresión cíclica con un máximo al final de la fase G1 e indetectable en el resto del ciclo. Aunque su secuencia presenta homologías con aquellas de las ciclinas N, no es capaz de sustituirlas funcionalmente en una cepa *cln⁻* (Ogas *et al.*, 1991) (Figura 3).

CLB5 y *CLB6* fueron aislados como supresores del fenotipo *cln⁻*. A pesar de su homología con las ciclinas mitóticas, de las que hablaremos posteriormente, se transcriben y actúan en la fase G1 al igual que las ciclinas *Cln1* y *Cln2* (Epstein *et al.*, 1992; Kühne *et al.*, 1993; Schwob y Nasmyth, 1993). Su inactivación está mediada por el enzima *Ubc9*, responsable de la conjugación con ubiquitinas (Seufert *et al.*, 1995) (Figura 3).

1.1.3.- Factores de transcripción reguladores del punto "START".

Los genes de expresión cíclica, se pueden dividir en tres grupos según las secuencias *cis* que se encuentren en su promotor:

A.- El primer grupo tiene un motivo llamado Elemento SCB (*Swi4/Swi6 cell Cycle Box*, "CACGAAA") que actúa como elemento activador de genes exclusivos del final de la fase G1. Se encuentra, entre otros, en: *CLN1* y *CLN2* (Nasmyth *et al.*, 1991), *HO* (Nasmyth, 1993; Struhl, 1993), *HCS26* (Ogas *et al.*, 1991).

El factor de transcripción responsable de esta activación es el llamado SBF y es un complejo heteromérico formado por dos proteínas: *Swi6p* (sirve de soporte y no tiene capacidad de unirse a DNA) y *Swi4p* (se une a *Swi6p* por su extremo carboxilo terminal y al DNA por su extremo amino terminal)(Koch *et al.*, 1994).

A. -

CICLINAS G1		CICLINAS MITOTICAS	
Cln1p Cln2p	Gemación	Clb3p Clb4p	Fases finales de la replicación del DNA Duplicación del citoesqueleto
Clb5p Clb6p	Fases iniciales de la replicación del DNA	Clb1p Clb2p	Citoquinesis Represión de la transcripción de Cln1p y de Cln2p.
Si Clb5p ó Clb6p no son funcionales, Cln1p ó Cln2p pueden reemplazarlas.			
Cln3p		Modulador de la expresión de las ciclinas G1 y G2.	

B. -

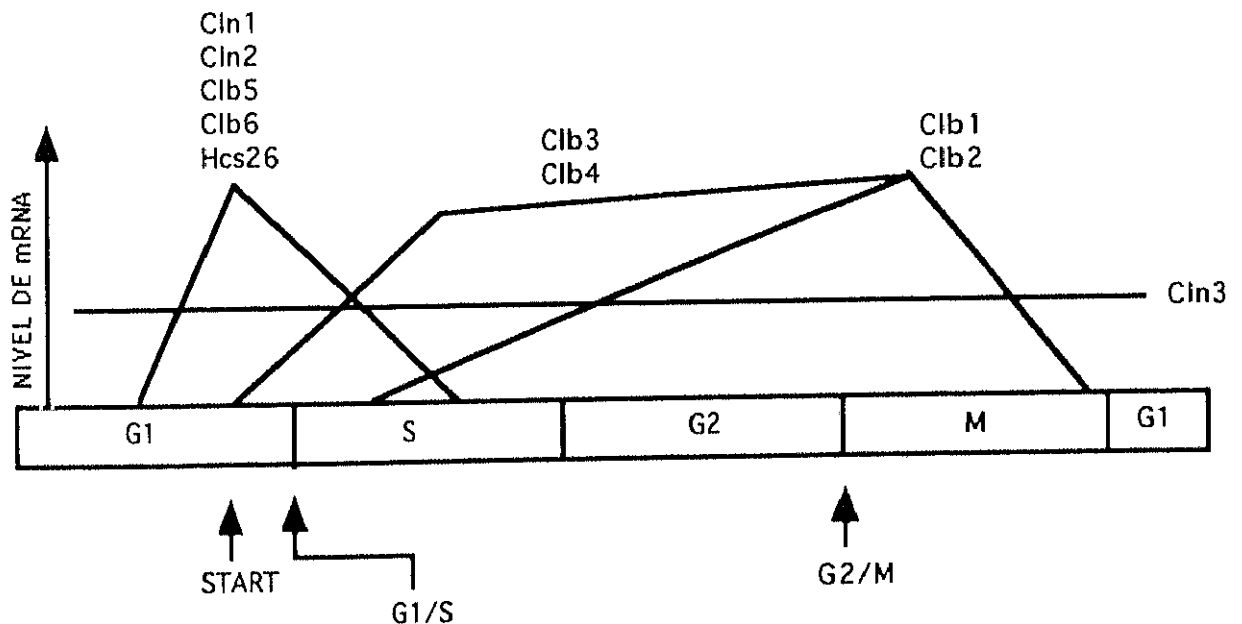


FIGURA 3: A.- DIFERENTES TIPOS DE CICLINAS Y PROCESOS EN LOS QUE INTERVIENEN.
B.- NIVEL DE TRANSCRIPCION DE LAS CICLINAS A LO LARGO DEL CICLO CELULAR.
Su expresión es periódica, produciéndose un máximo para las ciclinas G1 justo antes del punto "START", y otro para las ciclinas G2 justo antes de la mitosis.

SBF ha sido detectado en todas las etapas del ciclo (Dirick *et al.*, 1992) y su actividad se regula de manera post-traducciona. Para su activación, requiere la formación del complejo Cln3/Cdc28 (Koch *et al.*, 1994). A su vez, y tras el punto "START", es reprimido por el complejo Clb2/Cdc28 al unirse éste a Swi4p. La represión ejercida sobre SBF por Clb2/Cdc28 es prioritaria a su activación por Cln3p (Amon *et al.*, 1993).

B.- El segundo grupo tiene un motivo MCB (Mlul Cell Cycle Box, "ACGCGTNA"). No es exclusivo de una fase determinada del ciclo. Se encuentra en diversos genes como *CLB5*, *CLB6*, *SWI4* y en la mayoría de los genes responsables de la síntesis de DNA (Koch *et al.*, 1994).

El factor de transcripción responsable de esta activación es el llamado MBF, y es un complejo heteromérico formado por dos proteínas: Swi6p (sirve de soporte y no tiene capacidad de unirse a DNA) y Mbp1p (se une a Swi6p por su extremo carboxilo terminal y al DNA por su extremo amino terminal) (Koch *et al.*, 1993).

Al igual que SBF, MBF también se transcribe a lo largo todas las etapas del ciclo (Dirick *et al.*, 1992) y su actividad también se regula de manera post-traducciona. Existen evidencias de que se active por el complejo Cln3/Cdc28, aunque el mecanismo para esta activación aún se desconoce (Koch *et al.*, 1994).

C.- El tercer grupo lo forman aquellos factores de transcripción que se expresan al final del ciclo: *SWI5*, *ACE2*, *MCM1* y *SSF*.

SWI5 se expresa en la fase G2 del ciclo. Su transcripción esta regulada por un activador que forma un complejo ternario junto con los factores Mcm1p (Lydall *et al.*, 1991) y *SSF* (Treisman *et al.*, 1992). Además, Mcm1p también es requerido para la transcripción de *CLB1* y *CLB2*.

Swi5p y Ace2p regulan la transcripción de algunos genes expresados en el período inicial de la fase G1 del ciclo celular (p.e: *HO*) (Dohrmann *et al.*, 1992). La actividad de estas dos proteínas está a su vez regulada directamente por Cdc28p. La fosforilación de Swi5p por Cdc28p cuando Swi5p es sintetizado (fases G2 y M), evita su entrada al núcleo. Por lo tanto, los genes a los que activa Swi5p sólo se expresan al final de la mitosis, cuando el complejo Clb/Cdc28 es degradado (Moll *et al.*, 1991). Una vez dentro del núcleo, la transcripción de los genes por Swi5p activados es proporcional a la vida media de ésta (Tebb *et al.*, 1993).

1.1.4.- Ciclinas Mitóticas.

Las ciclinas mitóticas, también llamadas ciclinas B o G2, fueron descritas originalmente como proteínas cuya concentración oscilaba alcanzando su máxima concentración alrededor de la citoquinesis (Evans *et al.*, 1983). Son miembros de una gran familia de proteínas, que presenta funciones diversas a lo largo del ciclo celular eucariota, y donde la mayor parte actúan como subunidades reguladoras en el complejo Ciclinas/CDK (kinasas dependientes de ciclinas) (Amon *et al.*, 1994).

La mayor parte de las ciclinas B involucradas en la mitosis son sintetizadas en la fase G2 y degradadas alrededor de la anafase. Su destrucción es importante aunque no esencial para el desacoplamiento del citoesqueleto y la citoquinesis (Amon *et al.*, 1994). Su proteólisis implica su ubiquitinación (Seufert *et al.*, 1995) y depende de unas secuencias específicas amino-terminales llamadas "cajas de destrucción" (Glutzer *et al.*, 1991).

CLB1 y *CLB2* codifican una pareja de ciclinas B, con un 77% de identidad en su secuencia aminoácídica. Fueron aisladas como supresores de una mutación en *CDC28*.

Su expresión es cíclica con un máximo al principio de la fase G2. La ausencia de ambas produce la parada del ciclo en esta fase. En el ciclo mitótico actúan coordinando la mitosis y la citoquinesis (Surana *et al.*, 1991) (Figura 3). Paradójicamente, en el ciclo meiótico son de expresión residual y totalmente prescindibles, lo que indica que su función difiere en ambos ciclos (Grandin *et al.*, 1993). La inhibición de la actividad quinasa de Clb/Cdc28 puede estar regulada por Cdc15p (Surana *et al.*, 1993) que, a su vez, se trata de una serín-treonín-quinasa (Schweitzer y Philippsen, 1991).

CLB3 y CLB4 son otra pareja de ciclinas B, no esenciales, con un 57% de identidad en sus secuencias aminoácidas. Su expresión es cíclica observándose un máximo al principio de la fase S (Fitch *et al.*, 1992) (Figura 3). En el ciclo mitótico, actúan regulando la replicación del DNA y la duplicación del citoesqueleto. En el ciclo meiótico se expresan justo antes de la división reduccional y aunque su función no ha sido aún determinada, se ha comprobado que son dispensables para una esporulación normal (Grandin *et al.*, 1993).

1.1.5.- Dinámica de las ciclinas.

Cln3p es la iniciadora del ciclo celular (Figura 4) (Tyers *et al.*, 1993). Dependiendo del tamaño celular, Cln3p aumenta la expresión de los factores de transcripción SBF y MBF (Nasmyth, 1994). En el punto "START", regulada por dichos factores de transcripción, se activará la expresión de las ciclinas. Además, las Clns sufrirán un ciclo de retroalimentación positivo que incrementará su expresión al máximo (Cross *et al.*, 1991). Las ciclinas ejercerán entonces su función desencadenando un cascada de procesos que tendrán como consecuencia la replicación del material genético y cambios morfogénicos que darán lugar a la gemación.

Además, la transcripción de CLN1 y CLN2 tendrá como consecuencia la inactivación del sistema de ubiquitinación responsable de la proteólisis de las ciclinas mitóticas (Amon *et al.*, 1994). Esto dará lugar a una acumulación de las Clbs que inactivarán la expresión de las Clns por secuestro de Swi4p, que quedará unido al complejo Clb/Cdc28. Las ciclinas B también sufren un ciclo de retroalimentación positiva, es decir, activan su propia síntesis (Amon *et al.*, 1993).

Así, y ya en las fases del ciclo posteriores a "START", las ciclinas mitóticas generarán una serie de procesos que tendrá como consecuencia la segregación del material cromosómico y la reorganización del citoesqueleto y del material celular que concluirá en la mitosis y en la citoquinesis.

De manera aún desconocida, quizás por la falta de represión por parte de las Clns inexistentes en este punto del ciclo, se activa la proteólisis de las ciclinas mitóticas iniciándose la salida de la fase M. El hecho de que la transcripción de las Clbs sea incompatible con la de las Clns permite, en la fase G1, la total degradación de las primeras, creándose así las condiciones propicias para comenzar un nuevo ciclo celular (Amon *et al.*, 1994).

1.2.- Apareamiento.

En *S. cerevisiae* existen dos tipos de células haploides sexualmente diferentes, α y a . Estos dos tipos pueden aparearse entre sí para formar diploides. Para ello, las células no sólo tienen que estar expuestas a células de tipo sexual opuesto sino tienen además que hallarse en el período de la interfase entre el final de la mitosis y el punto "START" (Murray *et al.*, 1993).

Las células de tipo sexual opuesto son detectadas por la presencia de una señal química: un péptido de bajo peso molecular o "Factor a", segregado por las células a y detectado por receptores en la superficie de las células α . A su vez, las células α segregan "Factor α ", un péptido similar al anterior que se une a receptores situados en la superficie de las células a (Murray et al., 1993).

Cuando los factores de apareamiento se unen a sus receptores, activan un complejo sistema intracelular de transducción de señales (Figura 5) que activa dos vías diferentes: una que detiene el ciclo celular en el punto "START"; y otra que induce la expresión de los genes implicados en el apareamiento. Esta cascada de señales puede ser activada a lo largo de todo el ciclo pero, sólo aquellas células que habiendo finalizado la mitosis sufren la parada del ciclo son aptas para la conjugación (Murray et al., 1993).

Una vez parado el ciclo mitótico, las células se aparean gracias a la formación de proyecciones especializadas que se alargan hacia otras células de tipo sexual opuesto. Cuando se encuentran, ambas paredes celulares se cohesionan en el punto de contacto, y la membrana plasmática de ambas células se fusiona creando un citoplasma común. Consecuentemente, los dos núcleos se unen para dar lugar a un único núcleo diploide. La célula diploide recién formada, en condiciones apropiadas, vuelve al ciclo mitótico pasando por el punto "START" y se reproduce normalmente por gemación (Figura 1) (Murray et al., 1993).

1.3.- Ciclo meiótico.

En condiciones del medio de baja concentración de amonio y una fuente de carbono pobre, los diploides de *Saccharomyces cerevisiae* inician un proceso de esporulación que implica una meiosis y origina cuatro esporas haploides.

Aún en un medio propicio, la esporulación sólo se lleva a cabo en células con un determinado genotipo. Es decir, las células α tienen el alelo α del locus MAT (las células a tienen a su vez el alelo a. De esta manera, las células α expresan una proteína activadora ($\alpha 1$) responsable de la activación de los genes específicos α . Además, tienen una proteína represora ($\alpha 2$) que inhibe la expresión de los genes a. Las células a expresan dos polipéptidos, $a 1$ (responsable de la activación de los genes específicos a y $a 2$ (de función desconocida) (Figura 6) (Herskowitz, 1988). Sólo los diploides que presenten la combinación MAT α /MATa serán capaces de esporular. La razón principal es la formación de un complejo $a 1/\alpha 2$ que inhibe la expresión del gen *RME 1* (represor de meiosis) (Mitchell et al., 1986), que es expresado normalmente en las células haploides (Herskowitz, 1988).

Al iniciar el proceso de esporulación, las células duplican su cuerpo polar del huso. Esta duplicación coincide con la replicación del DNA, la cual rápidamente da lugar a la formación de los cuerpos sinápticos. Este estadio (paquitena de la profase I meiótica) es común a la mayoría de los organismos con reproducción sexual. Las células sufren ahora la meiosis I o recombinacional. Posteriormente, los cuerpos polares del huso se separan (metafase I de la profase meiótica) y no se observan ni los cuerpos sinápticos ni los cromosomas. Más tarde, en la anafase I se alarga el huso acromático y se duplican de nuevo los cuerpos polares del huso. El proceso de meiosis II o reduccional empieza ahora con la metafase II; los cuerpos polares del huso duplicados se separan y se observa un haz de microtúbulos entre ellos. Alrededor suyo se forma la pared de las cuatro protoascosporas; la membrana nuclear permanece intacta mientras que los dos pares de cuerpos polares del huso se separan y migran hacia cada ascospora en formación; se desplaza también el contenido citoplasmático y las mitocondrias. Las paredes en formación van alargándose hasta cerrarse. Entonces los cuerpos polares del huso se disocian de la pared. Las ascosporas, alargadas en un principio, maduran engrosando su pared y tomando una forma esférica (Miller, 1989).

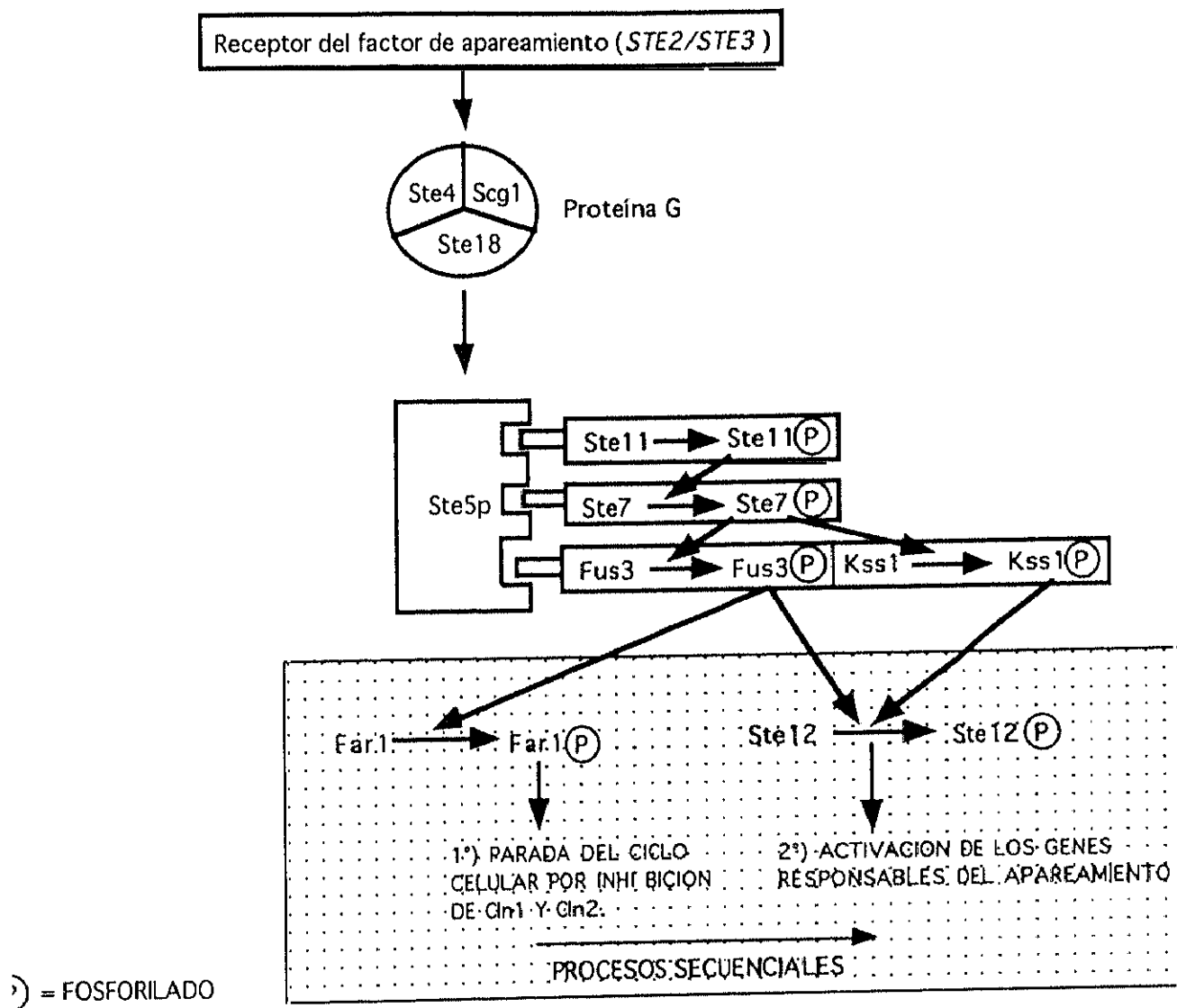


FIGURA 5: VIA DE TRANSDUCCION DE SENALES INDUCIDA POR EL FACTOR DE APAREAMIENTO.
El factor de apareamiento, al unirse a su receptor en la membrana celular, activa una proteína G formada por tres subunidades. Su activación desencadena una cascada de proteína-quinasas, ancladas en Ste5p, que tendrá como resultado final la parada del ciclo celular y posteriormente la activación de los genes responsables del apareamiento.

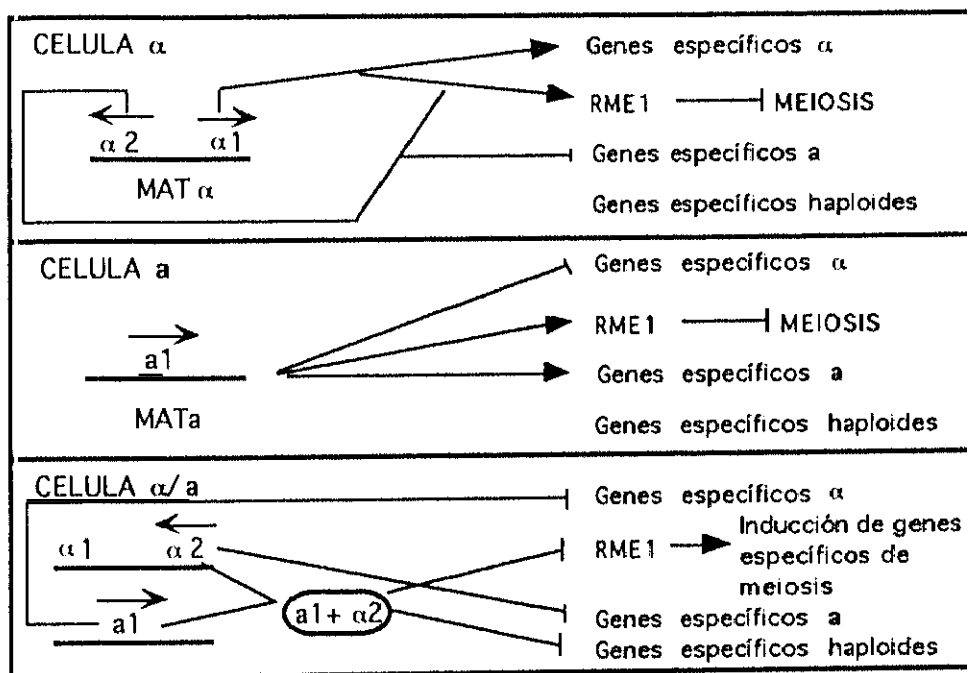


FIGURA 6: VISION MOLECULAR DE LA ACTIVACION DE LA MEIOSIS EN *S. cerevisiae*.

Los péptidos codificados tanto en el locus MATa como en el α son responsables de modular la expresión de genes que determinan el tipo sexual de la célula y de inhibir la meiosis en el caso de células haploides.

→ = Activación
 —| = Inhibición

Existen mutaciones que afectan a una sola de las dos fases meióticas, o bien evitan una de las dos, dando como producto final dos esporas diploides (esporas apomíticas): los mutantes *spo13* sufren un defecto que soslaya la meiosis I (Buckingham *et al.*, 1990), por el cual algunos cromosomas se segregan como si lo hicieran en la meiosis I y otros como si lo hicieran en la meiosis II (Malavasic y Elder, 1990).

2.- LA RESPUESTA A NUTRIENTES MEDIADA POR LA VIA Ras-AMPC.

Los genes *RAS* codifican proteínas de bajo peso molecular que median, vía AMPC, en una amplia variedad de procesos de transducción de señales en células eucariotas. En *S. cerevisiae*, median en la decisión celular entre crecimiento o parada del ciclo en G_0 y esporulación (Broach, 1991).

Principalmente la vía se activa gracias al producto del gen *CDC25*, que codifica una proteína de intercambio GDP-GTP (Camonis *et al.*, 1986). *Cdc25p* tiene tres regiones funcionalmente diferentes: Una esencial para el crecimiento en glucosa, otra requerida para la esporulación aunque no para el desarrollo mitótico, y una última necesaria para la esporulación y para la gluconeogénesis aunque no para el crecimiento en presencia de glucosa. La zona carboxilo terminal de *Cdc25p* interacciona directamente con *Ras2p* activando así el resto de la vía (Munder *et al.*, 1988).

Existen dos genes que regulan la actividad de la adenilato ciclasa (*Cdc35p*), *RAS1* y *RAS2*. (Murray *et al.*, 1993). Las proteínas Ras son sintetizadas como precursores citoplasmáticos. Para alcanzar su localización final en la cara interna de la membrana plasmática tienen que ser procesadas y finalmente farnesiladas (Broach, 1991). La activación de estos genes por *Cdc25p* supone un incremento del AMPC por hidrólisis de ATP. Contrariamente, su función se ve disminuida por el incremento de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), codificadas por los genes *IRA1* y *2*, que interaccionan con el complejo GTP/RAS, hidrolizan el GTP e inactivan el complejo (Murray *et al.*, 1993) (Figura 7).

La formación de AMPC por la adenilato ciclasa activa a una serie de proteínas quinasas (*TPK1*, *TPK2*, *TPK3*) (Toda *et al.*, 1987). Las Tpk's son responsables de dos hechos que provocan la progresión del ciclo mitótico: la inhibición de la esporulación por represión del gen *IME1* (Inductor de la meiosis) (Malone, 1990) y la activación de *Cln3p* (Hubler *et al.*, 1993). También se ha demostrado que un incremento en la señal de AMPC inhibe, temporalmente y de una manera dependiente del tamaño celular, la expresión de *Cln1p* y *Cln2p* (aunque no *Cln3p*). Este hecho pone de manifiesto la dependencia que existe entre el punto "START" y el tamaño celular (Baroni *et al.*, 1994; Tokiwa *et al.*, 1994; Hartwell, 1994) (Figura 7).

3.- MORFOGENESIS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

La polaridad celular es fundamental para el desarrollo y el correcto funcionamiento de todos los organismos. Su definición más simple es "una organización celular asimétrica" (Chant, 1994).

Las células de *S. cerevisiae* sufren un crecimiento polarizado durante dos etapas de su ciclo vital: durante la formación de la yema en el ciclo mitótico y durante el desarrollo de la proyección de apareamiento. Durante la gemación, la orientación de la polaridad está determinada por un programa interno de patrones de gemación que es específico del tipo celular: las células haploides geman de manera axial y las diploides lo hacen de manera bipolar. En el patrón bipolar,

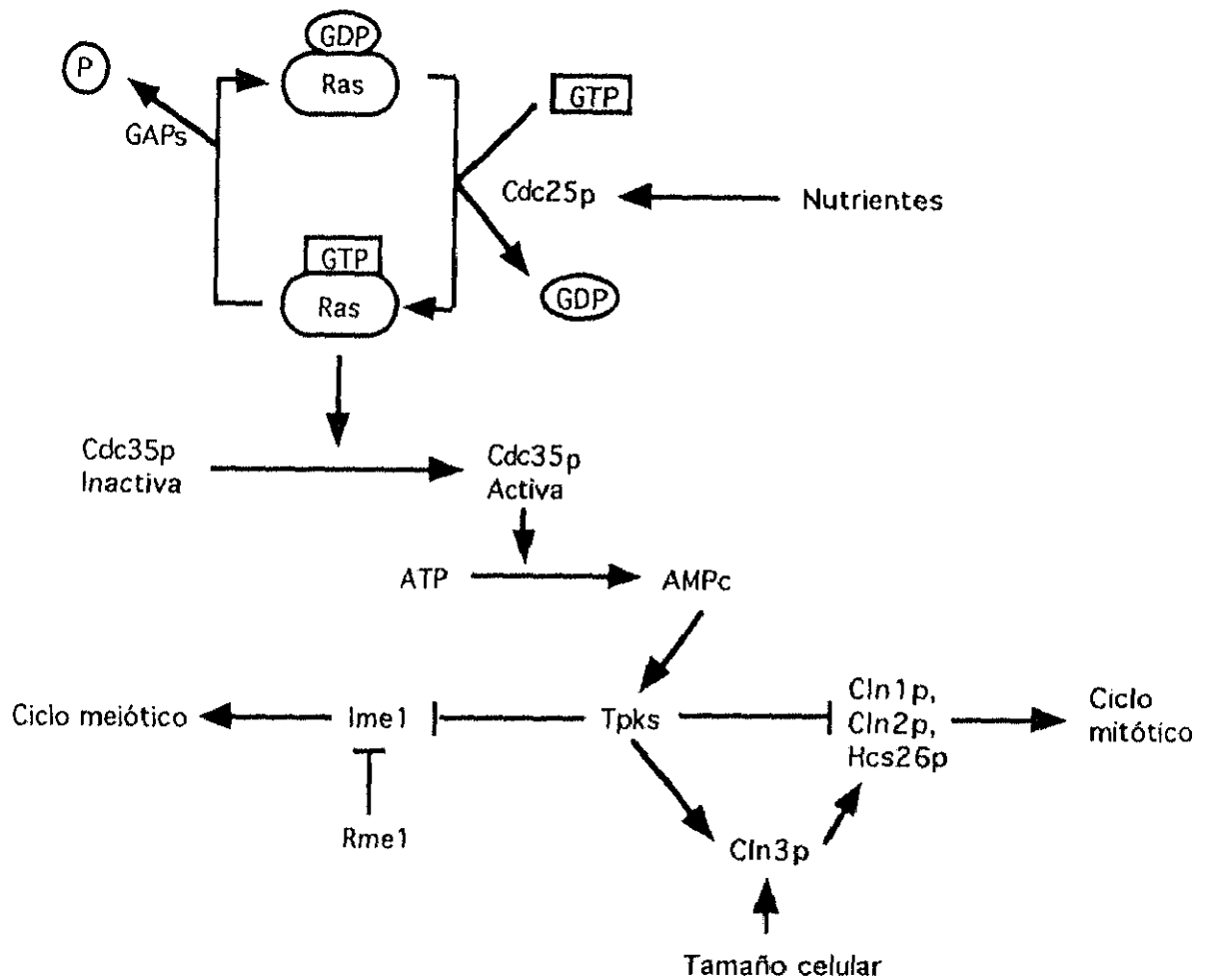


FIGURA 7: LA VIA RAS/AMPc y EL CICLO CELULAR. La señal se transduce desde la membrana celular, hasta el núcleo. La proteína Ras activada por su unión a GTP fosforila la adenilato ciclasa (Cdc35p) que transforma el ATP en AMPc. Este, a su vez, activa a las Tpk (proteín-quinasa dependientes de AMPc), que inhibirán la esporulación, activarán la expresión de Cln3p e inhibirán la expresión de otras ciclinas G1.

las yemas nacen en extremos opuestos de las células contrastando con el axial, donde las nuevas yemas nacen en un punto adyacente a la gemación anterior (Figura 8). En el apareamiento, la orientación de la polaridad está determinada por la posición relativa de una célula respecto a otra de tipo sexual opuesto (Figura 8)(Madden *et al.*, 1993; Chant, 1994).

La gemación es una división celular asimétrica en la cual la yema crece pero la célula madre no. Antes de que se forme la yema, ciertos componentes de la célula se distribuyen de manera polarizada para producir un crecimiento selectivo de la yema y para preparar la división del núcleo entre la célula madre y la hija.

Ciertas estructuras, incluyendo la actina y los microtúbulos, están orientadas paralelamente al eje célula madre/célula hija (Chant, 1994). La actina cortical se polariza en el área por donde crece la membrana en la yema y los cables de actina se prolongan desde la célula madre a la hija (Kilmartin *et al.*, 1984). Los microtúbulos citoplasmáticos se extienden desde el cuerpo polar del huso hasta la yema. En la mitosis, estos microtúbulos sitúan el núcleo en la frontera entre las dos células y alinean el cuerpo polar del huso en el eje madre-yema (Byers, 1981).

El citoesqueleto de actina envía vesículas secretoras a los sitios de crecimiento de la yema por medio de una miosina de clase V, codificada por el gen *MYO2*. Esta se une a las vesículas y las impulsa a lo largo de los cables de actina hacia la yema donde se fusionan con la membrana plasmática (Chant, 1994).

Numerosas proteínas se unen al sitio de gemación y permanecen en el extremo de la yema durante su crecimiento: Cdc42p (Ziman *et al.*, 1993), Bem1p, calmodulina (Cmd1p)(Brockhoff *et al.*, 1992), Myo2p y Smy1p (Lillie *et al.*, 1994), la proteína de unión a actina, Abp1 (Drubin *et al.*, 1988), Cap2p o proteína protectora de actina (Amatruda *et al.*, 1992) y Spa2p (Snyder *et al.*, 1991). Algunas de estas proteínas están implicadas en el establecimiento de la polaridad (Bem1, Cdc42), otras en el crecimiento de la superficie celular (Myo2p y la calmodulina). Otras controlan el ensamblaje de la actina (Cap2p y Abp1p) y algunas son de función desconocida aún (Spa2p y Smy1p).

Un segundo grupo de proteínas, las asociadas a los filamentos del eje madre/hija, Cdc3p-Cdc10p-Cdc11p-Cdc12p, las "septinas", se ensamblan al sitio de gemación, aunque permanecen alrededor del nexo de unión madre/hija a lo largo del ciclo celular, formando un anillo de filamentos de 10nm de diametro bajo la membrana plasmática (Kim *et al.*, 1991; Ford *et al.*, 1991).

De esta manera, la actina, los microtúbulos y las proteínas responsables de la localización de la yema se ensamblan de una manera polarizada y sincronizada antes de la emergencia de la yema (Chant J., 1994).

3.1.1.- Establecimiento de la polaridad (Figura 9)

En la búsqueda de mutantes de ciclo celular que tuvieran un defecto en gemación y polaridad, se identificó el gen *CDC24*. En su ausencia, las células crecen de una manera amorfa sin llegar nunca a gemar. Esto se debe a que la secreción y el crecimiento de la superficie celular, que debería estar localizados en la yema, se producen uniformemente a lo largo de toda la superficie celular; Cdc3p, Spa2p, Bem1p y Cap2p se hallan deslocalizados.

Posteriormente se identificaron *CDC42*, *CDC43* y *BEM1* como esenciales para el establecimiento de la polaridad celular (Adams *et al.*, 1990).

Cdc42p es una GTPasa de la familia Rho/Rac implicada en el control de la organización de la actina en mamíferos. Presenta en su extremo carboxilo un residuo de geranilación que permitirá su anclaje a la membrana (Johnson *et al.*, 1990). *CDC43*

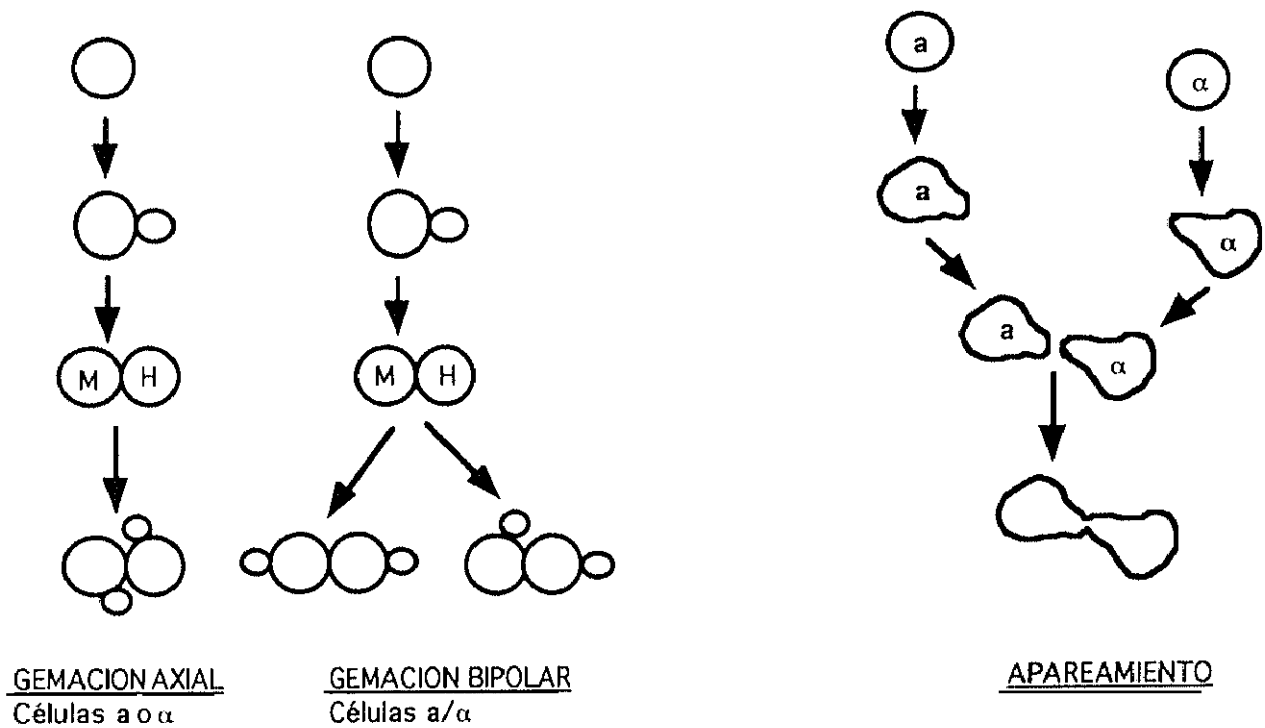


FIGURA 8: POLARIDAD CELULAR DURANTE LA GEMACION Y EL APAREAMIENTO EN *S. cerevisiae*.

Las células haploides geman de manera axial, al lado de la cicatriz de la gemación anterior. Las células diploides geman de manera bipolar o bipolar/axial, en el extremo celular opuesto a la gemación anterior. En el apareamiento las células emiten una prolongación hacia la célula de tipo sexual opuesto que al unirse dará paso a la fusión citoplasmática y nuclear.

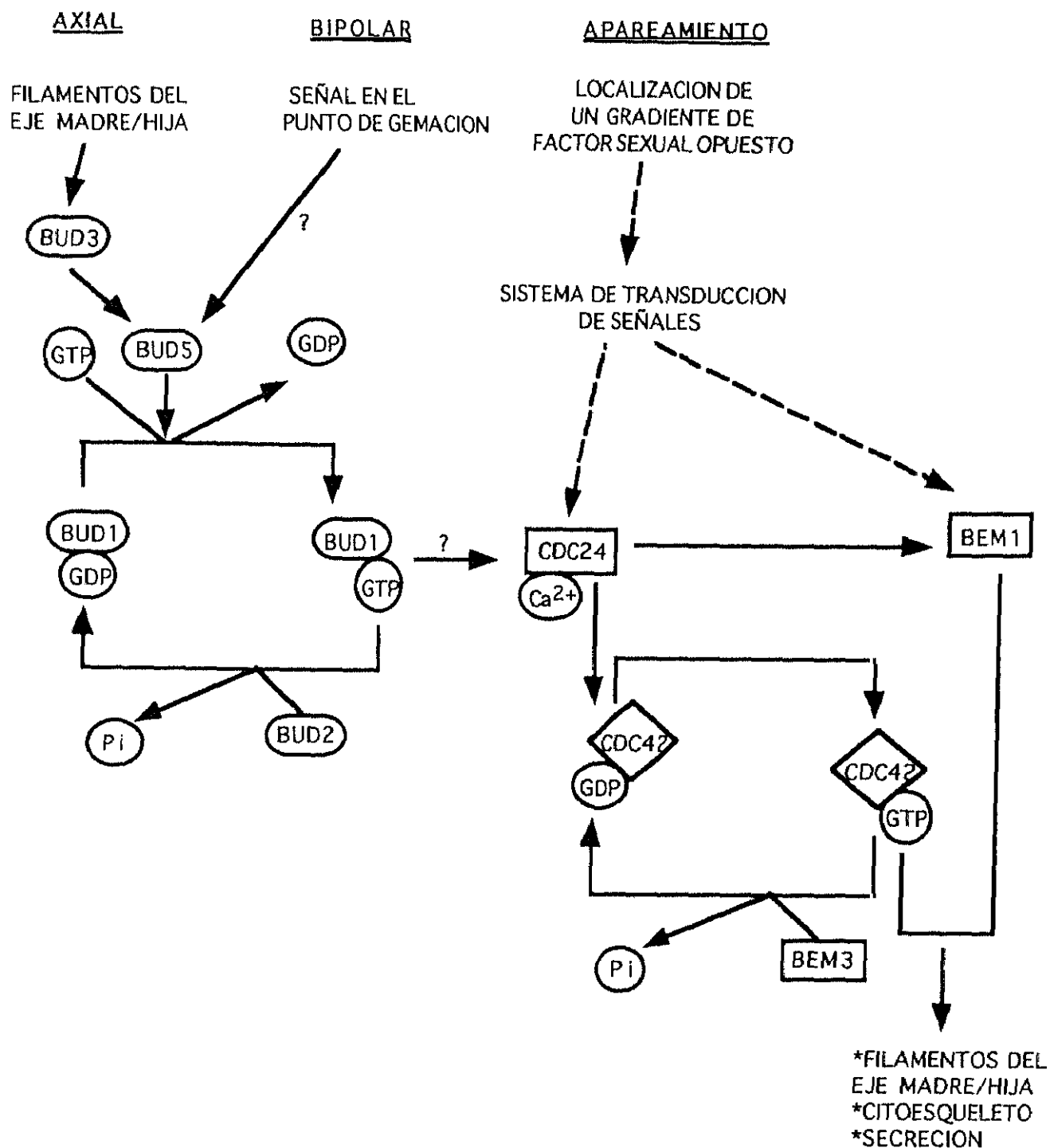


FIGURA 9: CONTROL DE LA POLARIDAD CELULAR. Se pueden diferenciar por una parte los mecanismos responsables de la elección del sitio de gemación y por otra los reponsables del crecimiento polarizado. Ambos procesos estan relacionados y se dan de una manera secuencial: primero la célula "decide" el lugar de gemación o apareamiento para posteriormente comenzar la orientación del material intracelular hacia ese punto. Ambos procesos se rigen por la activación de proteínas de tipo RAS (Bud1p, Cdc42p), cuyos factores de intercambio GTP/GDP son Bud5 y Cdc24p y donde Bud2p y Bem3p actuan como GAPs (activadoras de GTPasas). Tanto el mecanismo que determina el patrón bipolar de gemación como la relación entre Bud1p y Cdc24p sólo son modelos sin existir evidencias de su mecanismos de acción.

codifica la subunidad β de la geranil-geranil transferasa responsable de la modificación de Cdc42p (Finegold *et al.*, 1991). La actividad GTPasica de Cdc42p se ve incrementada, "*in vitro*", por Bem3p (Ron, 1991).

El mecanismo por el que se controla la polaridad celular aún no está claro. Podría ser que en la transición entre GTP/Cdc42p y GDP/Cdc42p, mediada por Cdc24p (factor de intercambio de nucleótidos de Cdc42p) (Zheng *et al.*, 1993), se regulase la unión de Cdc42p al sitio de gemación (Ziman *et al.*, 1991).

Bem1p es la única proteína implicada en la polaridad que no interacciona con Cdc42p, aunque parece que se une a Cdc24p. Se localiza en el sitio de gemación y en el extremo de la yema a lo largo del crecimiento (Chant, 1994).

3.1.2.- Elección de la orientación de un eje para la polaridad celular.

Hasta ahora todos los genes que se han citado eran imprescindibles para la formación de un eje de polaridad celular. Existe un segundo grupo, los cinco genes *BUD*, que controlan la orientación del eje y consecuentemente la posición de la yema.

Estos genes no son esenciales puesto que en su ausencia las células pueden seguir un ciclo celular normal aunque con una gemación espacialmente aleatoria (Bender *et al.*, 1989; Chant *et al.*, 1991; Chant *et al.*, 1991).

Bud3p y Bud4p son requeridos para el patrón axial de gemación aunque no para el bipolar (Chant *et al.*, 1991). La función de Bud4p es desconocida por ahora. Bud3p se ensambla en una estructura de doble anillo alrededor del nexo de unión entre célula madre e hija. Durante la citoquinesis, el doble anillo se divide dejando una copia en cada célula. Estos anillos se desintegran según se forma el siguiente eje en la siguiente ronda de gemación. Este hecho nos indica que la función de Bud3p es transitoria y que marca el lugar de gemación. La base donde se ensambla esta proteína son los filamentos de actina del nexo de unión madre/hija. Como se indicó anteriormente, estos filamentos se ensamblan en etapas anteriores previas a la gemación y quedan en la unión entre las dos células mientras la yema crece (Chant *et al.*, 1994).

En ausencia de Bud1p, Bud2p y Bud5p la gemación se vuelve aleatoria. De esta manera, se puede postular que la gemación axial se debe a un correcto funcionamiento de todos los genes *BUD* y la bipolar se debe a la ausencia o inactivación de *BUD3* y de *BUD4* (Chant *et al.*, 1991).

El mecanismo de gemación bipolar es desconocido por ahora. Se propone que los extremos celulares queden de alguna manera marcados durante la gemación (Chant *et al.*, 1994).

3.1.3.- El ciclo de la GTPasa Bud1p (Figura 9)

Para que las células gemen en posiciones predeterminadas, las señales espaciales deben ser transducidas a la maquinaria que establece la polaridad celular. Un ciclo en que esta implicada la GTPasa Bud1p y además del que Bud2p y Bud5p parecen ser los reponsables.

Bud1p, Bud2p y Bud5p codifican, respectivamente, una proteína ras relacionada con las GTPasas (Chant *et al.*, 1991), una proteína activadora de GTPasas (Park *et al.*, 1993) y un factor intercambiador de nucleótidos (Chant *et al.*, 1991). Probablemente, Bud5p y Bud2p regulen a Bud1p (Park *et al.*, 1993).

Una hipótesis sobre el modo de acción de Bud1p es la siguiente. Esta proteína oscilaría entre el citoplasma y la membrana plasmática dependiendo de su unión a GTP o a GDP. De esta manera, podría reclutar a otras proteínas como Cdc24p y unir las al sitio de gemación (Park *et al.*, 1993). Otra posibilidad, es que Bud1p esté distribuida uniformemente en la membrana plasmática y que sea localmente activada en el sitio de gemación, desencadenando así, vía Cdc24p, el proceso de gemación (Chant *et al.*, 1994).

Bud1p interacciona con Bud3p y con Bud4p (Chant *et al.*, 1991) y con Cdc24p, reponsable de la polaridad celular (Bender *et al.*, 1989). Bud5p interacciona con Bem1p (Chant *et al.*, 1991).

3.1.4.- Polaridad durante el apareamiento.

Durante el apareamiento, las células haploides deben cambiar su patrón axial habitual para elongarse hacia la célula de tipo sexual opuesto donde quiera que ésta se halle.

Cdc24p, Bem1p y Spa2p son esenciales para este proceso. Cdc42p podría también estar implicada. Sin embargo, los genes *BUD* no parecen estarlo, lo cual no es sorprendente, pues orientan el eje de crecimiento respondiendo a un patrón celular interno, mientras que el apareamiento es una señal externa (Chant *et al.*, 1991).

4.- CONCEPTO DE INTEGRIDAD Y AUTOLISIS.

En el crecimiento de las células a lo largo del ciclo celular, es necesaria la síntesis de la pared celular, tanto de la célula hija como en el lugar en que ha tenido la gemación en la célula madre.

La caracterización de mutantes autolíticos ha permitido el estudio de los requerimientos funcionales para la integridad celular, puesto que si a lo largo del ciclo la pared no es funcional se producirá la muerte celular (Cid *et al.*, 1994).

Así, se impulsó el desarrollo del análisis genético de funciones presumiblemente relacionadas de manera directa con la construcción de la pared celular. Se buscaban alteraciones en los procesos biosintéticos de los polímeros de pared (quitina o glucano) y procesos relacionados con el control de enzimas hidrolíticas, las cuales de alguna manera controlarían las modificaciones de la pared (glucanasas, quitinasas...) (Cabib *et al.*, 1975).

De esta manera, se aislaron genes reponsables de un fenotipo autolítico termosensible, es decir, cuya lisis es dependiente de la temperatura (Nombela *et al.*, 1984; Torres *et al.*, 1991; Molero *et al.*, 1993; Cid *et al.*, 1994). Este tipo de mutantes fueron aislados en una búsqueda de cepas que liberaran su contenido intracelular y que se detectaran midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (Cabib *et al.*, 1975). Complementariamente, estos mutantes se pueden aislar de manera más precisa por citometría de flujo con yoduro de propidio. Sólo las células que hayan perdido su integridad serán permeables a dicho fluorocromo (de la Fuente *et al.*, 1991).

Merece la pena diferenciar en dos grupos este tipo de mutantes: aquellos cuyo fenotipo es complementado por la presencia de un estabilizador osmótico, y los que no. Esta distinción es importante porque el defecto en los primeros debe ser consecuencia de un defecto primario de la pared celular, mientras que en los segundos, la afectación de la pared puede deberse a la expresión final de un defecto celular no relacionado con ésta (Cid *et al.*, 1994).

El concepto de integridad puede ser basado en la funcionalidad de los genes identificados según la siguiente aproximación experimental: el aislamiento de mutantes que se lisan rápidamente cuando existe crecimiento activo en condiciones no permisivas. Cualquier gen cuya inactivación conlleve a un fenotipo terminal autolítico, puede ser considerado, en principio, esencial para la integridad celular (Cid *et al.*, sometido a revisión).

MATERIALES Y METODOS

1.- MICROORGANISMOS Y MATERIAL GENICO UTILIZADOS

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas utilizadas en este trabajo, su genotipo así como su procedencia, se detallan en la tabla I.

1.2. Cepas de *Escherichia coli*.

En la tabla II, se reflejan las estirpes empleadas en este trabajo.

1.3. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

Las cepas utilizadas en este trabajo, su genotipo así como su procedencia, se detallan en la tabla III.

1.4. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados se muestran en la tabla IV.

1.5. Genotecas.

1.5.1. Genoteca genómica de *S. cerevisiae*.

Genoteca comercial contruida mediante digestión parcial del DNA total de *S. cerevisiae* AB320 (*a/α*, *ho*, *ade2-1*, *can1-100*, *leu1-12*, *lys2-1*, *met4-1*, *trp5-2*, *ura3-1*), con *Sau3A* y ligada al punto *Bam*HI del vector centromérico YCp50. Los insertos tienen un tamaño medio de 10-15 Kb (P.N.A.S. U.S.A., 1985, 82:4373-4378).

1.5.2. Genoteca de cDNA de *S. pombe*.

Genoteca de cDNA de *S. pombe*, cedida amablemente por Dra. Sánchez, que fue construida ligando al punto *Bst*XI del vector pDB20 el cDNA (al que previamente se había unido el monómero (ACAC) para permitir su unión orientada 5'-3' (Fikes *et al.*; Nature 346:291-294).

1.5.3. Genoteca de cDNA de *H. Sapiens*.

Genoteca de cDNA de células HEPG2 contruida ligando a los puntos *Bst*XI y *Not*I del vector pAB23-BXN el cDNA, al que se había unido un adaptador *Bst*XI 5' sobresaliente y *Not*I 3' sobresaliente.

2.- MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se esterilizan bien en autoclave a 121°C durante 20 minutos, o bien por filtración.

2.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Para lograr la solidificación del medio, cuando es pertinente, se añade "Bacto"-agar a una concentración final de 15 g/l.

Medio L B (Luria-Bertani) medio rico para el crecimiento habitual bacteriano (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro sódico 10 g/l).

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Procedencia o referencia
S288C	MAT α , <i>mal</i> , <i>gal2</i>	M.O. Halvorson, Waltham U., Mass., U.S.A.
373	MAT α , <i>ade2</i>	A. Jimenez, C.B.M., Madrid
TD28	MAT α , <i>ura3</i> Δ 52, <i>inos1-131</i> , <i>can</i> ^R	F. del Rey, F. Ciencias, Salamanca.
DBY746	MAT α , <i>trp1-289</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3</i> Δ 52, <i>his3</i> Δ 1	F. del Rey, F. Ciencias, Salamanca.
L2C16b	MAT α , <i>lyt1-1</i>	G. Molero, F. Farmacia, U.C.M.
L2C24d	MAT α , <i>lyt1-1</i> , <i>ura3</i> Δ 52	G. Molero, F. Farmacia, U.C.M.
DU3	MAT α/a , <i>lyt1-1/lyt1-1</i> , <i>ura3</i> Δ 52/ <i>ura3</i> Δ 52	G. Molero, F. Farmacia, U.C.M.
RH210-3c	MAT α , <i>cdc15</i> , <i>ade2-1</i> , <i>his4</i> Δ 34, <i>trp1</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>bar1</i>	C. Kühne, Biozentrum, Basilea, Suiza.
L119-7d	MAT α , <i>dbf2-1</i> , <i>ura3</i> Δ 52, <i>trp1/2</i> , <i>ade1</i>	L.H. Johnston, M.R.C., Londres, Gran Bretaña.
MY1	MAT α/a , <i>cdc15/CDC15</i> , <i>ade2-1/ADE2</i> , <i>his4</i> Δ 34/ <i>HIS4</i> , <i>trp1/TRP1</i> , <i>ura3/ura3</i> Δ 52, <i>leu2/LEU2</i> , <i>bar1/BAR1</i> , <i>NPK1/npk1-1</i> .	ESTE TRABAJO
MY20	MAT α/a , <i>cdc15(lyt1)/CDC15</i> , <i>npk1/npk1-1</i> .	ESTE TRABAJO
MY30	MAT α/a , <i>cdc15/cdc15</i> , <i>npk1(lyt1)/NPK1</i> .	ESTE TRABAJO
MY40	MAT α/a , <i>dbf2-1/DFB2</i> , <i>ura3</i> Δ 52/ <i>ura3</i> Δ 52, <i>trp1/2/TRP1/2</i> , <i>ade1/ADE1</i> , <i>NPK1/npk1</i>	ESTE TRABAJO

Tabla II. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Procedencia o referencia
DH5 α	<i>rec A1, end A1, gyr A96, thi 1, hsdR17, sup E44, (rk, mk⁺), rel A1, ϕ80^R, lacZΔM15, F⁻</i>	Hanahan, 1985
JM109	<i>rec A1, end A1, gyr A96, thi 1, hsdR17, sup E44, (rk, mk⁺), rel A1, λ, Δ(lac-pro A,B) (F'<i>tra</i> D36pro A,B lac^q ZΔM15)</i>	Yanish-Perron, 1985
HB101	<i>hsd gR, hsd gM, rec A13, sup E44, lac Z4, leu B6, pro A2, thi1, Sm^r, ara 14, galK2, xyl15, F⁻, λ</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969

Tabla III. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Procedencia o referencia
SM1	h ⁺ , ura ⁻ , leu ⁻ .	S. Moreno, Salamanca
SM2	h ⁻ , ura ⁻ , leu ⁻ .	S. Moreno, Salamanca

Tabla IV. Características de los plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características relevantes	Utilidad	Origen/referencia
Bluescript KS	<i>ori lac Z</i> (MCS) fl PT3 PT7 Amp ^R	Vector de expresión en <i>Escherichia coli</i>	Stratagene.
Ylp5	<i>ori</i> TCr URA3 Amp ^R	Vector bifuncional integrativo en <i>S. cerevisiae</i> .	Struhl <i>et al.</i> , 1979.
YCp50	<i>ori</i> ARS1 CEN4 URA3 TCr Amp ^R	Vector bifuncional de bajo número de copias en <i>S. cerevisiae</i> .	Jonhston y Davis, 1984.
pHR70	<i>ori</i> ARS1 CEN4 URA3 <i>Lac Z</i> Amp ^R	Vector bifuncional de bajo número de copias en <i>S. cerevisiae</i> .	M.J. Mazón, I.I.B, Madrid.
pDB20	<i>ori</i> ARS1 URA3 pADC1(MCS) tADC1 Amp ^R	Vector bifuncional, multicopia e inducible por la alcohol deshidrogenasa	S. Moreno, Salamanca
pAB23BXN	<i>ori</i> ARS1 URA3 pGAP(MCS)tGAP Amp ^R	Vector bifuncional, multicopia e inducible por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.	M. Sánchez, U.C.M.
pBS9	<i>ori</i> ARS1 URA3 Amp ^R CDC15 CEN4	Vector bifuncional de bajo número de copias en <i>S. cerevisiae</i> portador del gen CDC15	Schweitzer <i>et al.</i> , 1991

Medio SOB utilizado en la transformación por el método de Hanahan (1985) (triptona 12 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro sódico 10mM, adicionándose tras su esterilización cloruro potásico y cloruro magnésico a una concentración final 2.5 mM y 10 mM respectivamente).

Medio SOC empleado para expresar la resistencia al antibiótico en experimentos de transformación por el método de Hanahan (1985) (medio SOB al que se le añade, en esterilidad, glucosa hasta una concentración final 20mM).

A estos medios se añaden, cuando es necesario:

- Ampicilina (50 µg/ml) para seleccionar células resistentes.
- Xgal (20 µg/ml) e IPTG (0.1 mM) para seleccionar clones portadores del gen que codifica la β-galactosidasa.

2.2 Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

Para lograr la solidificación del medio, cuando es pertinente, se añade "Bacto"-agar a una concentración final de 20 g/l.

Medio YE, medio completo empleado para el cultivo de levaduras (extracto de levadura 10 g/l). Como fuente de carbono se añade según elección glucosa 20 g/l, galactosa 30 g/l, acetato potásico 20 g/l, glicerol 2%, etanol 2% o rafinosa 20 g/l.

Medio YPD, medio rico empleado rutinariamente para el crecimiento (extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l, peptona 20 g/l).

Medio SD, medio sintético utilizado para seleccionar y mantener los transformantes de levaduras o para determinar las auxotrofías de una determinada cepa (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 6.7 g/l, glucosa 20 g/l, aminoácidos proteinogénicos o bases nitrogenadas -según necesidad- a una concentración final de 30 mg/ml).

Medio MPE, utilizado principalmente para inducir la esporulación (extracto de levadura 10 g/l, glucosa 50 g/l, extracto de carne 30 g/l).

Medio ME, medio de esporulación (acetato potásico 10 g/l, extracto de levadura 1 g/l, glucosa 0.5 g/l).

2.3 Medios de cultivo para *Schizosaccharomyces pombe*.

Medio YED, medio completo empleado para el cultivo de levaduras (extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l).

Medio YE, medio empleado para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Inhibe la conjugación y la esporulación (0.5% extracto de levaduras, 3% glucosa).

Medio YES, medio empleado para el crecimiento vegetativo. Es medio YE al que se le han adicionado 50-250 mg/l de adenina, leucina, uracilo e hidrocloreto de lisina.

3.- MANIPULACION DE MICROORGANISMOS.

3.1 Condiciones de crecimiento y manipulación de cepas.

3.1.1. Cepas de *E. coli*

Estas cepas se conservan a -20°C en viales con glicerol al 50%. El cultivo en medio líquido se realiza a 37°C con agitación vigorosa durante el tiempo necesario. El cultivo en medio sólido generalmente es en placa y se incuba a 37°C durante 24 horas.

3.1.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Las estirpes utilizadas se conservan congeladas a -70°C en viales con glicerol al 15%. Las cepas transformadas se conservan en tubos de agar inclinado el medio adecuado a una concentración final doble que la normal, a 4°C.

El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo generalmente en placa, incubando el cultivo a una temperatura entre 24°-42°C, durante el tiempo necesario.

Para cultivo líquidos se usaron matraces de capacidad 2.5 veces superior al volumen del medio, incubándose en un baño con agitación y temperatura adecuada.

3.2 Determinación del crecimiento.

3.2.1. Turbidimetría

El grado de crecimiento de los cultivos se determinó mediante la medida de la turbidez del mismo, por lectura de la densidad óptica (DO) a 600nm en un espectrofotómetro Beckman 35. Las muestras se diluyeron convenientemente hasta que su DO se hallase en un intervalo de valores (0.05-0.5) para que existiera una linealidad entre la lectura de la DO y el número de células.

3.2.2. Recuento de células

La determinación de la concentración celular de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo se realizó con una cámara "Neubauer" cuentaglóbulos, por observación microscópica directa. La concentración en células/ml se obtuvo tras multiplicar por 10^4 el número de células contadas en 0.1mm^3 , espacio formado por cada uno de los cuadrantes, subdivididos a su vez en 16, de la retícula.

3.3. Determinación del porcentaje de viables en cultivo

3.3.1. Por citometría de flujo

Se llevó a cabo mediante la tinción selectiva de células con yoduro de propidio, según el método descrito por de la Fuente *et al.*, (1992); utilizando el analizador FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA) del Centro de Citometría de Flujo de la UCM. Para el análisis de datos se utilizaron los programas de Becton-Dickinson (San José, CA,): "FACScan Research Software" y "LYSYS II".

3.3.2. Por microscopía

Las observaciones se realizaron en un microscopio de contraste de fases Nikon Optiphot, usando ioduro de propidio como fluorocromo indicador de muerte celular e iluminación de epifluorescencia.

3.3.3. Por valoración cualitativa de fosfatasa alcalina

En ocasiones era necesaria la búsqueda de un fenotipo lítico de una forma rápida y en una población grande de células en un medio sólido. Para ello se usó el reactivo 5-Bromo-4-Cloro-3-indolilfosfato. Este reactivo es un sustrato de fosfatasa alcalina que, al ser hidrolizado por dicha enzima, da lugar a una coloración azul.

Se añade la solución acuosa de la sal disódica del reactivo al medio de cultivo previamente atemperado a 50°C en una concentración final de 40 µg/ml y se tienden las placas normalmente. Para evitar la degradación del reactivo, estas placas se guardan en oscuridad.

Las cepas a analizar se siembran en las placas con el reactivo y se incuban a la temperatura deseada durante 24-48 horas. Al cabo de ese tiempo, las colonias lisadas aparecerán teñidas de color azul.

3.4. Técnicas de microscopía.

3.4.1. Microscopía de contraste de fases.

Las muestras de levaduras se observaron en un montaje húmedo, en un microscopio Nikon Optiphot, empleando un objetivo de contraste de fases 40x y un ocular 10x.

3.5. Tinción de núcleos.

Para la tinción de núcleos se usó el fluorocromo específico para ácidos nucleicos, ioduro de propidio.

Las células se permeabilizan primero con etanol al 70% durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se tratan con RNasa (1mg/ml) 30 minutos a 37°C. Para finalizar se tiñen con ioduro de propidio 0.005% y se observan bajo fluorescencia con un objetivo 100x, en un microscopio de contraste de fases Nikon Optiphot.

3.6. Técnicas genéticas.

3.6.1. Obtención de diploides.

Se utilizó la técnica descrita por Fink (1971). El aislamiento de los diploides se llevó a cabo bien directamente por selección de auxotrofías, o bien por aislamiento de cigotos utilizando un micromanipulador Leitz acoplado a un microscopio Wild de contraste de fases, sobre láminas de medio sólido de preesporulación (MPE). Posteriormente, éstas eran incubadas en una placa con medio (con el fin de proporcionar la humedad necesaria) durante 3-4 días a 24°C, tiempo tras el cual se hacían visibles las colonias diploides.

3.6.2. Esporulación.

Cuando se requirió la esporulación de algún diploide, éste se sembró primero en un medio rico dejándolo crecer 24 horas a 24°C. Pasado este tiempo, se sembró en medio de esporulación (sólido o líquido) incubándolo a 24°C hasta que la presencia de ascas se puso de manifiesto por observación microscópica.

3.6.3. Disección de ascas.

La disección de ascas se realizó según el método descrito por Johnston y Mortimer (1959), modificado por Bevan y Costello (1964), excepto en que la glusulasa (Endo Laboratories Inc., Wilmington, Delaware) se utilizó a una concentración del 10% entre 5 y 15 minutos. En estos trabajos se utilizaba el micromanipulador previamente citado.

3.7. Análisis del ciclo celular.

Para el análisis del ciclo celular, tanto mitótico como meiótico, se siguió el siguiente protocolo: Las células se permeabilizan primero con etanol al 70% durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se tratan con RNasa (1mg/ml) 30 minutos a 37°C. Para finalizar se tiñen con ioduro de propidio 0.005%.

El análisis se realizó en el citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA.), equipado con un Módulo Discriminador de Dobletes (DDM), del Centro de Citometría de Flujo de la UCM. 5000 células fueron estudiadas por muestra. Cellfit software (Becton-Dickinson, San José, CA.) fue el usado para el estudio de los datos permitiéndonos la discriminación entre agregados, dobletes y células simples.

3.8. Determinación de la fosforilación oxidativa.

Es una determinación cualitativa. Usamos 0.6 ml de una solución al 3% del reactivo 3,5,7-trifenil tetraazolio en 11ml de una sobrecapa de 70mM de fosfato sódico, 1% de glucosa y 1.5% de agar (Ogur *et al.*, Science 125, 928 (1957)). El reactivo si es oxidado en la ruta dará a la célula una coloración roja mientras que si no lo es las colonias quedarán con su color de origen.

4.- MANIPULACION DE DNA. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

4.1. Tampones utilizados.

Todos los tampones utilizados empleados en este apartado están descritos en el manual de laboratorio de Sambrook *et al.*, (1989).

4.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para la amplificación y extracción de DNA plasmídico de *E. coli*, se utilizaron principalmente dos métodos. Así, mediante el método descrito por Holmes y Quigley (1981) por ebullición de las células en presencia de lisozima, se obtenía DNA de forma rápida y en pequeña escala. Para la obtención de DNA en mayor escala y de mayor pureza se siguió el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Para las extracciones en las que se requería la obtención de DNA de gran pureza se realizó una lisis alcalina siguiendo el protocolo del kit de extracción comercial "Quiagen", basado en la adsorción del DNA a columnas para así separarlo de las diversas fracciones celulares.

4.3. Aislamiento de DNA total de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de DNA total de *S. cerevisiae*, se siguió básicamente el método descrito por Sherman *et al.*, (1983).

4.4. Aislamiento de RNA total de levaduras.

Para la obtención del RNA total de *S. cerevisiae* y de *S.pombe*, se siguió el siguiente protocolo:

Se crecen las células hasta una densidad óptica a 600nm de 0.4 unidades de absorbancia y se congelan. Una vez congeladas, se añade 250µl del tampón de lisis (20mM Tris-HCl, pH=7.5; 10mM EDTA; 150mM LiCl; 20mM NaCl; 0,1% SDS) y 250µg de bolas de vidrio estériles y lavadas con ácido. Posteriormente, se calientan 10 minutos a 60°C y rápidamente se enfrían en hielo. Más tarde, se completa la lisis celular con una agitación fuerte de 20 segundos (este paso se repite tres veces). Después, se centrifugan 10 minutos a 10.000 rpm y se recoge el sobrenadante que se mantendrá en hielo. Se vuelve a extraer el fenol residual con 150µl de tampón de lisis y se unen ambos sobrenadantes. Estos se purifican con fenol/cloroformo de la manera anteriormente descrita hasta que la interfase de la solución carezca de un residuo proteico. El RNA se precipita con una solución 0.1M de acetato potásico y 2.5 volúmenes de etanol frío; inmediatamente se centrifuga 10 minutos a 10 r.p.m. El residuo se disuelve, una vez seco, en agua estéril para su congelación posterior a -70°C.

4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La preparación de los geles de agarosa y de las muestras, así como el desarrollo de la electroforesis, se llevó a cabo según las técnicas descritas por Davis *et al.*, (1986). La concentración usual de agarosa ha sido de 0.8%, aunque podía variar desde 0.5% a 1.5% según las bandas a analizar. El tampón usado fue TAE 1x adicionando, como fluorocromo selectivo, bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. La electroforesis se realizó en cubetas "Bio-Rad wide minisubcell", "Bio-Rad subcell" y "BRL H6". Las bandas se visualizaron con un transiluminador que emite luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda; fotografiándose con una cámara "Polaroid" con película "Polaroid" 667 y filtro rojo Kenko R1 o con un escáner "Gelprinter" (Vicon industries inc. Melville, N.Y.).

4.6. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

Se usó el protocolo del kit "GeneClean" (BIO 101, La Jolla, CA.) basado en la adsorción del DNA a un polvo de vidrio especialmente preparado.

4.7. Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA/RNA.

La determinación del tamaño de los fragmentos lineales de DNA se llevó a cabo utilizando como patrones los diversos marcadores de peso molecular conocido suministrados por Boehringer Mannheim (Penzeberg, Alemania).

El índice de pureza se determinó midiendo la absorbancia del DNA/RNA en solución en una longitud de onda de 260 y 280 nm. La relación A_{260nm}/A_{280nm} , que determina la pureza, ha de ser siempre menor de 2.

La concentración de ácidos nucleicos se obtuvo midiendo la absorbancia a 260nm de longitud de onda. Como valor de referencia, se consideró que 1 unidad de absorbancia corresponde a 30 $\mu\text{g/ml}$ para oligonúcleotidos, 40 $\mu\text{g/ml}$ para RNA y 50 $\mu\text{g/ml}$ para DNA.

4.8. Digestión del DNA con endonucleasas.

La digestión del DNA con los distintos enzimas de restricción se llevó a cabo según se indica en Sambrook *et al.*, (1989), utilizando el material proporcionado por Boehringer Mannheim (Penzeberg, Alemania).

4.9. Desfosfatización del extremo 5' del DNA.

Para evitar en las ligaciones la recircularización del vector cuando este había sido cortado con un solo enzima de restricción, se procedió a la desfosfatización del extremo 5' del fragmento lineal. Se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) según el procedimiento descrito por Sambrook *et al.*, (1989); con material suministrado por Boehringer Mannheim (Penzeberg, Alemania).

4.10. Ligación del DNA.

De nuevo se siguieron las recomendaciones de Sambrook *et al.*, (1989); utilizando la DNA ligasa del fago T4 con su tampón correspondiente, procedentes ambos de la casa Boehringer Mannheim (Penzeberg, Alemania). Las ligaciones se realizaron, en el caso en que los extremos a unir fueran cohesivos, durante al menos 12 horas a 13°C; con los extremos romos, se harían a 22°C durante el mismo período de tiempo.

4.11. Transformación de DNA.

La transformación de plásmidos en las distintas cepas de *E. coli* se llevó a cabo habitualmente mediante el método descrito por Hanahan (1985). Aquellos plásmidos, que tras su integración en levaduras fueron recuperados y recircularizados, se transformaron por electroporación, usando un modelo "Electro Cell Manipulator 600 (BXT)", siguiendo la técnica descrita por Dower *et al.*, (1988).

La transformación de *S. cerevisiae* se realizó utilizando células enteras tratadas con cationes alcalinos (acetato de litio), según el método descrito por Ito *et al.*, (1983).

4.12. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA empleados como sondas fueron marcados radiactivamente con $(^{32}\text{P})\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, Amersham), por el procedimiento de "Random Primer", según la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1984), utilizando el kit de marcaje suministrado por la casa Amersham International. Se basa en el uso de una mezcla aleatoria de hexanucleótidos que, actuando como cebadores sobre una cadena de DNA desnaturalizado, permiten al fragmento "Klenow" de la DNA polimerasa I sintetizar la cadena complementaria, introduciendo nucleótidos marcados radiactivamente.

Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante cromatografía de filtración en minicolumnas de "Sephadex G-50" (Sambrook *et al.*, (1989)).

Se marcaron cada vez aproximadamente 25 ng de DNA, usando para hibridar 10^7 c.p.m totales.

4.13. Hibridación DNA-DNA.

4.13.1 Transferencia del DNA a una membrana de nylon.

Esta técnica se basa en la capacidad de las membranas de nylon cargadas positivamente de adsorber DNA desnaturalizado en condiciones alcalinas.

Para la desnaturalización del DNA, una vez realizada una electroforesis en agarosa de alta pureza, se sumergió dos veces el gel en una solución de ácido clorhídrico 0.25N durante 10 minutos; posteriormente y tras lavarlo con agua destilada se introdujo el gel 20 minutos en una solución neutralizante (0.4N hidróxido sódico, 1M cloruro sódico) para finalizar lavando el gel tres veces durante 10 minutos en una solución desnaturalizante (acetato sódico 3M, pH=5.5).

La transferencia, así como la fijación, del DNA a la membrana fue siempre unidireccional, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Una vez fijado el DNA a la membrana se usó como matriz para hibridar con sondas marcadas radiactivamente como anteriormente se ha descrito.

4.14. Hibridación RNA-DNA, técnica de Northern.

4.14.1 Transferencia del RNA a una membrana de nylon.

Esta técnica también, se basa en la capacidad de las membranas de nylon cargadas positivamente de adsorber RNA desnaturalizado.

La desnaturalización del RNA se realiza antes (a las muestras-8 μ l-se les añade MOPS 1x, 15 μ l de formamida y 5 μ l de formaldehído; y se calientan 15 minutos a 60°C) y durante la electroforesis usando un gel desnaturalizante (agarosa al 1%, 25% de formaldehído y 1x MOPS). El tampón de electrodos será 1x MOPS y 0.2% formaldehído.

La transferencia, así como la fijación, del RNA a la membrana fue siempre unidireccional, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Una vez fijado el RNA a la membrana, se usó como matriz para hibridar con sondas marcadas de DNA radiactivamente como anteriormente se ha descrito.

RESULTADOS

En un trabajo anterior, realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, se concluyó que la cepa mutante *lyt1* presenta un fenotipo lítico a 37°C durante el ciclo mitótico y, que tiene afectada la capacidad de esporulación independientemente de la temperatura de incubación. La lisis se produce siempre en el mismo punto del ciclo celular, con un tamaño de yema grande. El defecto en el ciclo mitótico es complementado por expresión en vectores multicopia del gen *SPO12* (Molero, 1992).

OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO

El objetivo de este trabajo fue la caracterización del fenotipo *Lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae*, así como el aislamiento del gen o genes cuya mutación era la responsable de dicho fenotipo. Complementariamente, también se consideró importante la posibilidad de aislar genes heterólogos capaces de complementar el fenotipo, pues se pensó que podría deberse a un defecto en una función conservada filogenéticamente.

1.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA CEPA MUTANTE *lyt1*

1.1.- Localización del punto de parada de la cepa *lyt1* en el ciclo celular

El estudio de los procesos que tienen lugar a lo largo del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* se pueden realizar además de con mutantes *cdc*, con agentes químicos que interfieren en el ciclo, parándolo en un punto determinado por inhibición de algún proceso imprescindible para su progresión.

Con el objeto de localizar el punto de parada de la estirpe mutante *lyt1*, se usaron hidroxurea y benomil. Además se estudió, mediante microscopía y citometría de flujo, el momento de la división nuclear en que ocurría la parada del ciclo celular a la temperatura restrictiva.

1.1.1.- Crecimiento en hidroxurea.

La hidroxurea es una droga que impide la síntesis del DNA por inhibición del enzima ribonucleótido reductasa (Timson, 1975) y previene la unión de pequeños fragmentos de ácidos nucleicos nucleares, mitocondriales y plasmídicos (Slater, 1973).

Si el punto de parada de la cepa mutante *lyt1* estuviera antes del punto de acción de la hidroxurea, la mutación se expresaría en su presencia dando lugar a un fenotipo lítico a 37°C.

Sin embargo, como se muestra en la figura 10, en presencia de 0.5M de hidroxurea, el mutante *lyt1* (L2C24d) se comporta como la cepa silvestre a 37°C, y aunque detiene su crecimiento no se lisa.

1.1.2.- Crecimiento con Benomil (MBC).

El benomil (MBC), metilbenzimidazol-2-il-carbamato, es un reactivo químico que previene la elongación del citoesqueleto por impedir el ensamblaje de los microtúbulos (Quinlan et al., 1980).

Al igual que sucede con la hidroxurea, si el fenotipo *Lyt1* fuera debido a un defecto que tuviera lugar después del ensamblaje de los microtúbulos, no se expresaría en presencia de benomil puesto que se habría bloqueado el ciclo en un punto anterior.

Eso es lo que ocurre en nuestro caso, como se muestra en la figura 11. En presencia de 0.5mM de benomil, disuelto en un 0.5% (v/v) de DMSO (Quinlan et al., 1980), las células se paran presentando un fenotipo de células en dobles y, a 37°C, no hay lisis.

FIGURA 10: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA ESTIRPE MUTANTE *lyt1* CON HIDROXIUREA.
 En presencia de hidroxurea 0.5 M, no se observa lisis a 37°C.

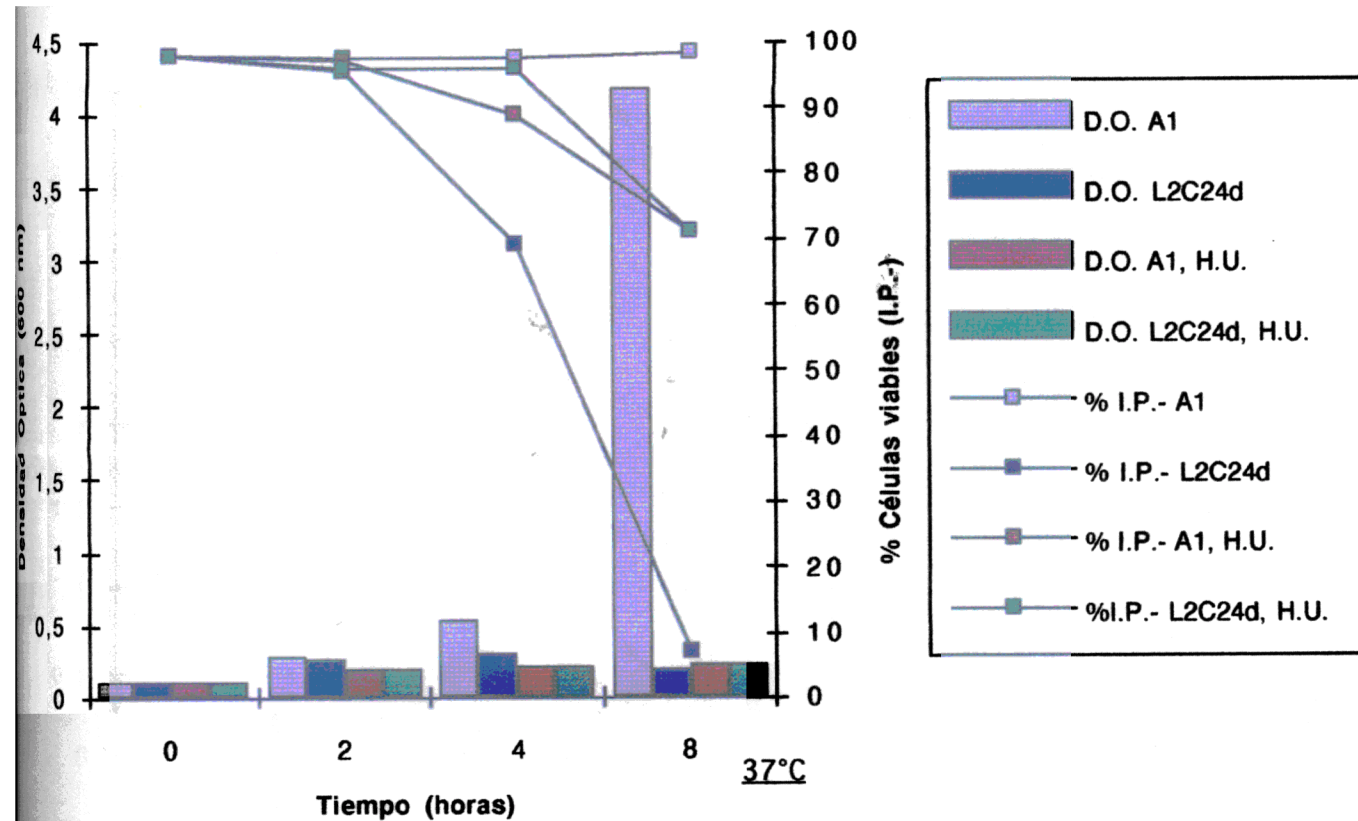
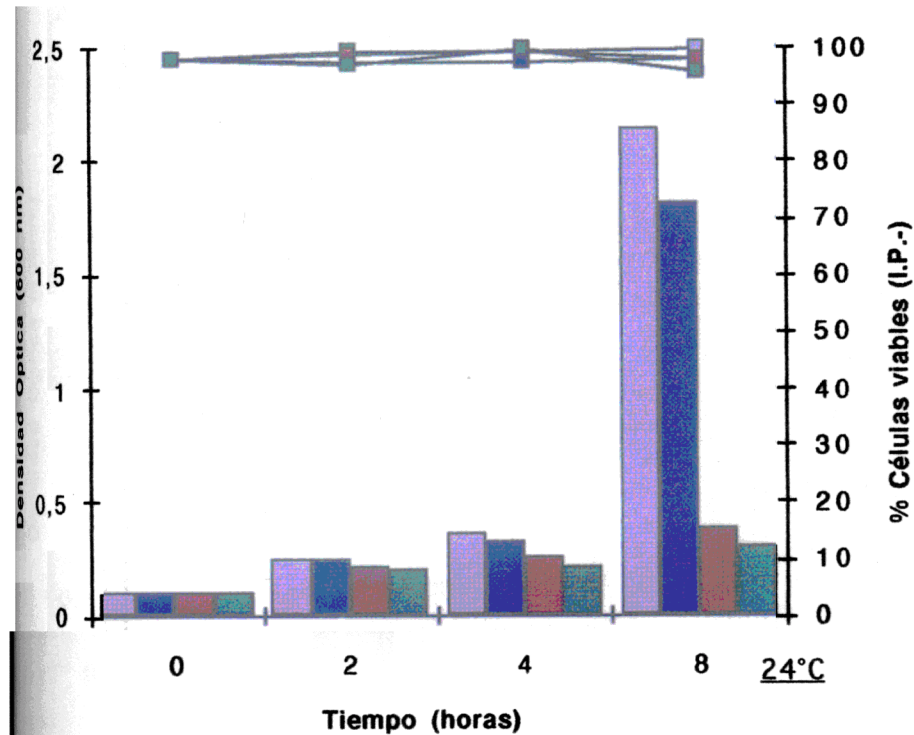
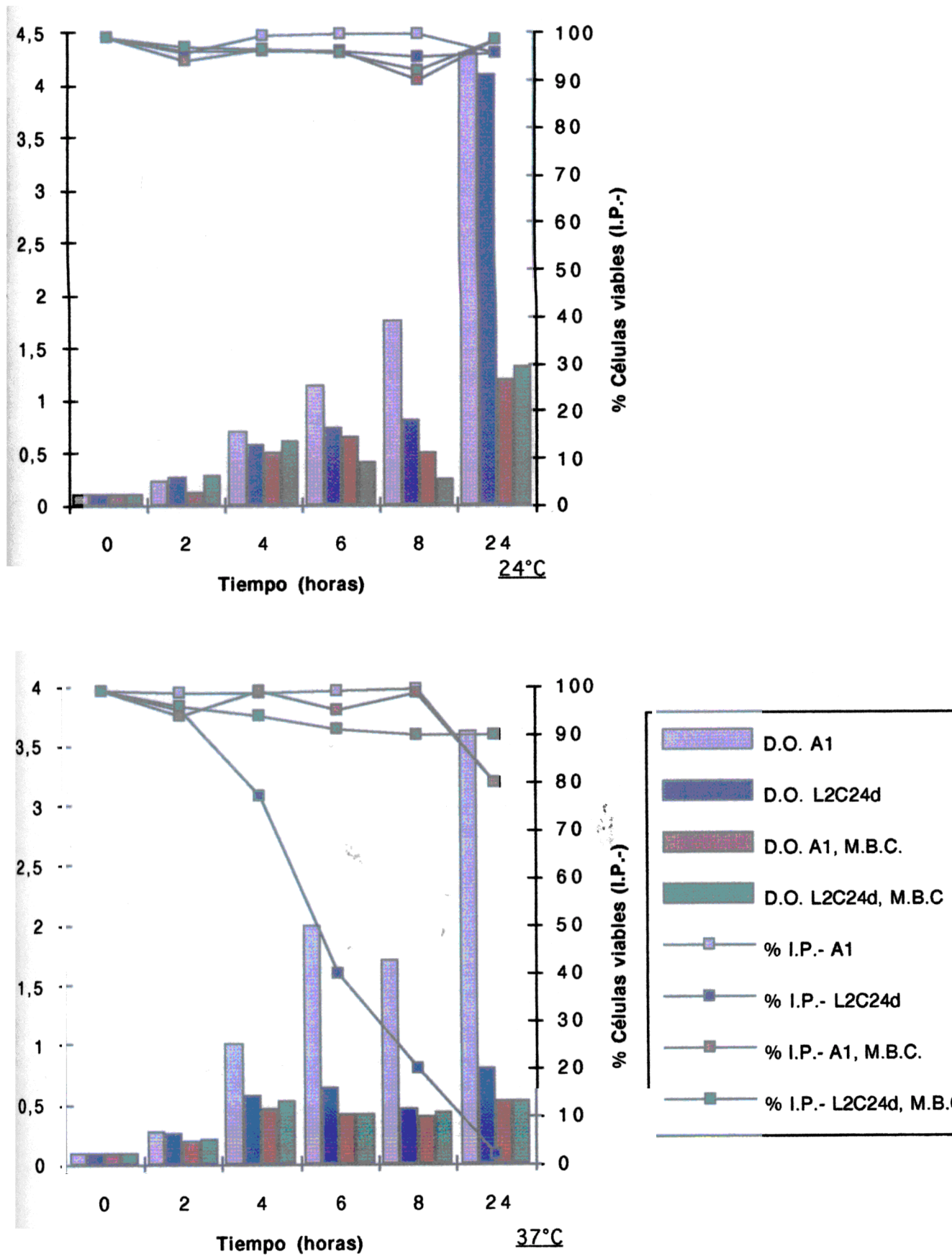


FIGURA 11: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA CEPA MUTANTE *lyt1* CON BENOMIL (MBC)
Una concentración 0.5 mM de MBC inhibe la lisis, en la cepa mutante *lyt1*, a 3



1.1.3.- Tinción de núcleos.

El material génico es desplazado después de duplicarse a lo largo del citoesqueleto para que tanto la célula madre como la hija queden con una copia de todo el genoma. Así, la distancia entre ambos núcleos en la célula en división es proporcional al tamaño del citoesqueleto.

Para comprobar que el citoesqueleto se hallaba duplicado y elongado en el momento de parada del mutante *lyt1* a 37°C, lo que confirmaría que la parada es posterior al punto de acción del benomil, decidimos hacer una tinción de núcleos con el fluorocromo yoduro de propidio (de la Fuente et al., 1991).

Procedimos a una incubación a la temperatura restrictiva de nuestro mutante. Tras 6 horas y una vez manifestado el fenotipo tomamos una muestra que fue fijada con etanol 70% e incubada en presencia de RNasa (para evitar un fondo inespecífico) 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se tiñeron con yoduro de propidio (0.005%) y se observaron en el microscopio (100X) con y sin iluminación de epifluorescencia.

Como se puede ver en las fotografías de la figura 12, los núcleos se encuentran en anafase, situados en los polos de la célula en división y el material génico totalmente dividido. Lo que indica que, en efecto, el citoesqueleto se encuentra totalmente alargado.

1.1.4.- Ciclo celular.

Para cuantificar lo anteriormente visto al microscopio, se procedió al estudio del la progresión de la replicación DNA a lo largo del ciclo celular de la estirpe mutante *lyt1*, tanto a 24°C como a 37°C, por citometría de flujo.

Como se muestra en la figura 13, mientras que a 24°C se pudo observar una transición periódica y normal entre las fases G1 y G2 del ciclo, a 37°C tras dos horas de incubación el ciclo se para en G2. También, y de una manera secuencial a la parada del ciclo, se puede apreciar el inicio de la lisis celular.

1.2- El proceso de autólisis depende de una síntesis activa de proteínas.

En este punto de la caracterización fenotípica de nuestro mutante, se creyó conveniente saber cómo era el crecimiento en otras fuentes de carbono distintas de glucosa, si era dependiente de una fuente de carbono fermentable y de una síntesis activa de proteínas. Existen mutantes de ciclo celular con un crecimiento limitado a glucosa/galactosa (F. Cross, comunicación personal).

1.2.1.- Crecimiento de la estirpe mutante *lyt1* en fuentes de carbono distintas de glucosa.

Se incubó la cepa L2C24d, portadora de la mutación *lyt1*, tanto a 24°C como a 37°C, en medio mínimo suplementado con galactosa o glicerol, como ejemplo representativo de una fuente de carbono fermentable y una oxidativa.

Como se muestra en la figura 14, el crecimiento es mínimo en estas dos fuentes de carbono, si lo comparamos con el crecimiento en glucosa, a ambas temperaturas. La lisis también decreció en estas fuentes de carbono, llegando a ser la diferencia máxima con respecto a glucosa, de un 70% en el caso de glicerol y de un 50% en el de la galactosa tras 24 horas de incubación a 37°C.

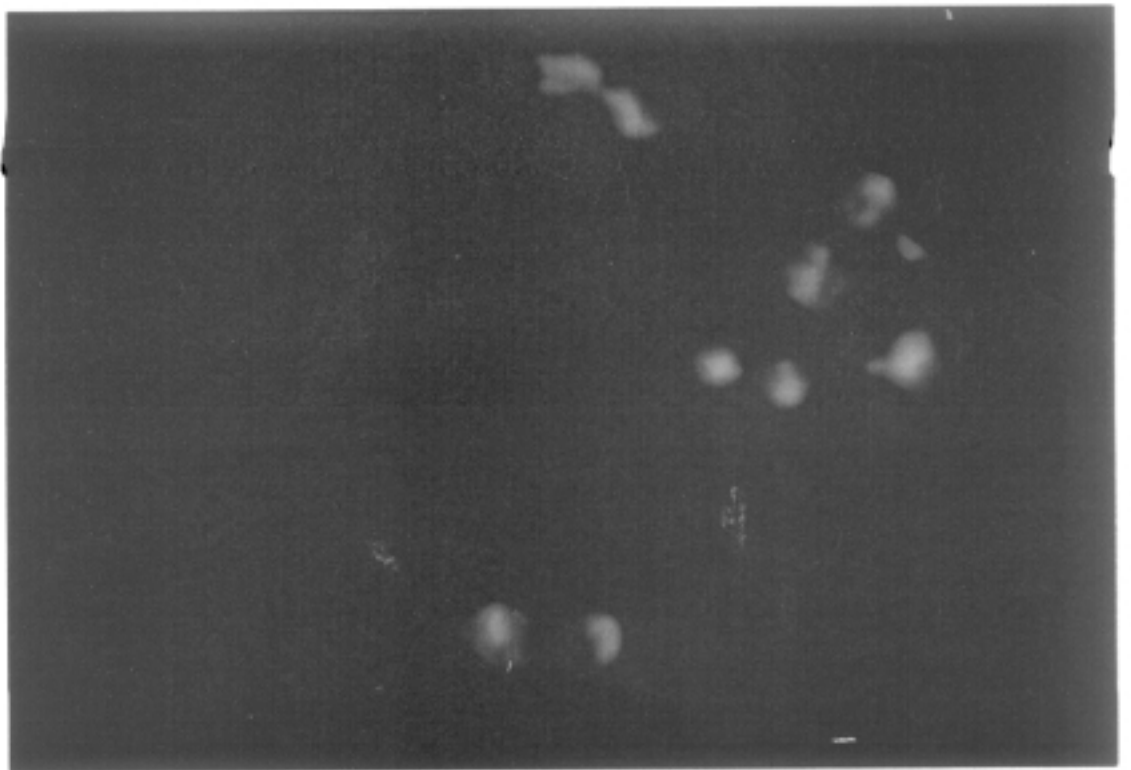
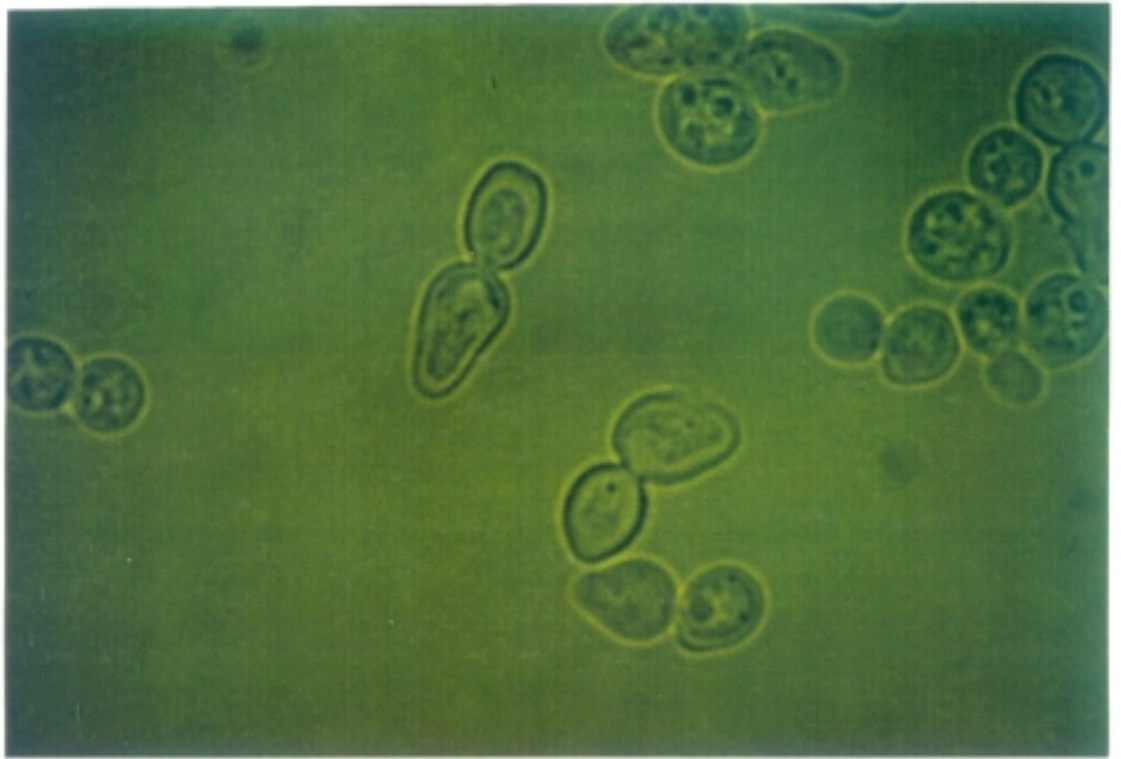


FIGURA 12: A.- Estirpe mutante *lyt 1*, tras una incubación de seis horas a 37°C (1000x).
 B.- Tinción de núcleos, con ioduro de propidio, de las células de la fotografía superior. Se puede observar que éstos se hallan divididos y separados, situados en los polos tanto la célula madre como la célula hija.

FIGURA 13: ESTUDIO CITOMETRICO DEL CICLO CELULAR DE LA CEPA MUTANTE *lyt 1*.
En la figura, las abcisas representan el número de células y las ordenadas la
intensidad de fluorescencia (FL2).

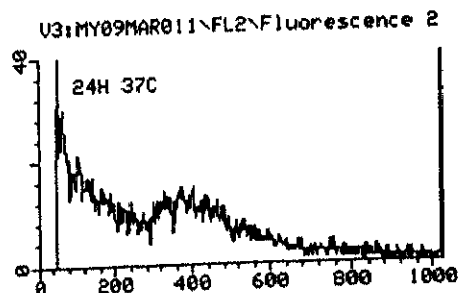
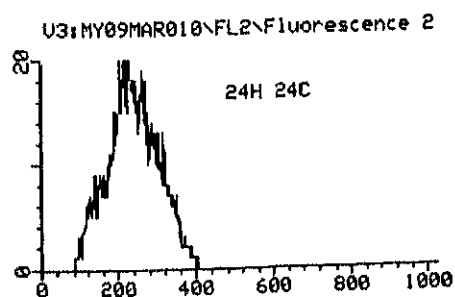
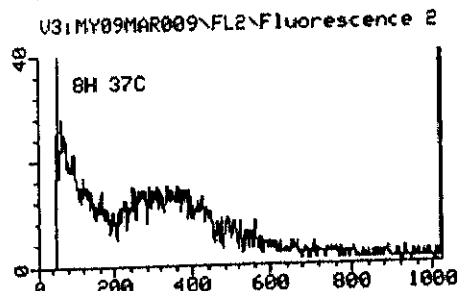
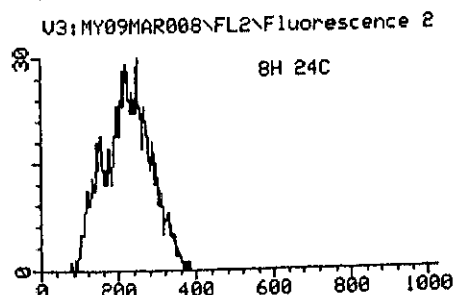
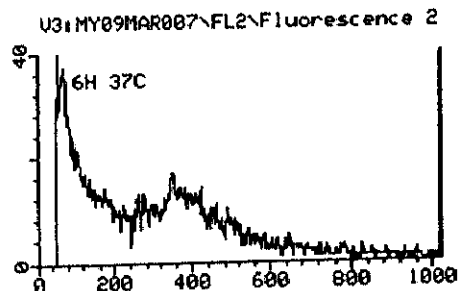
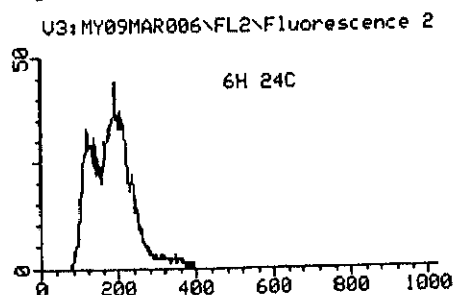
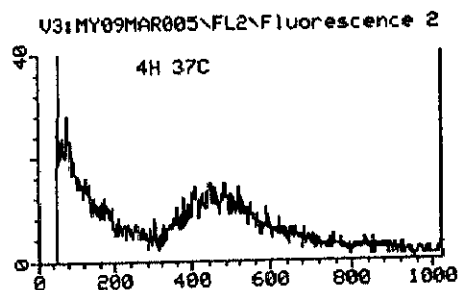
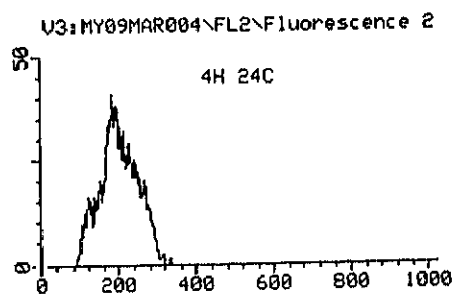
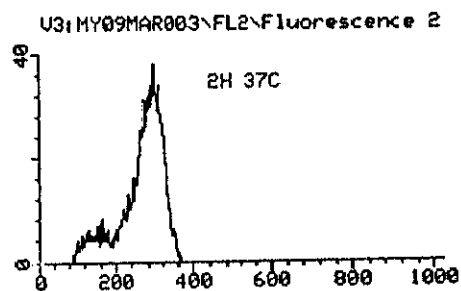
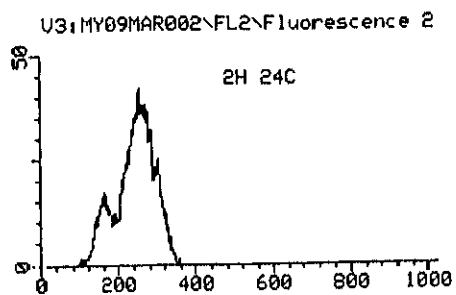
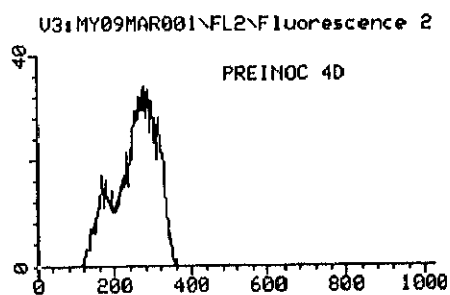
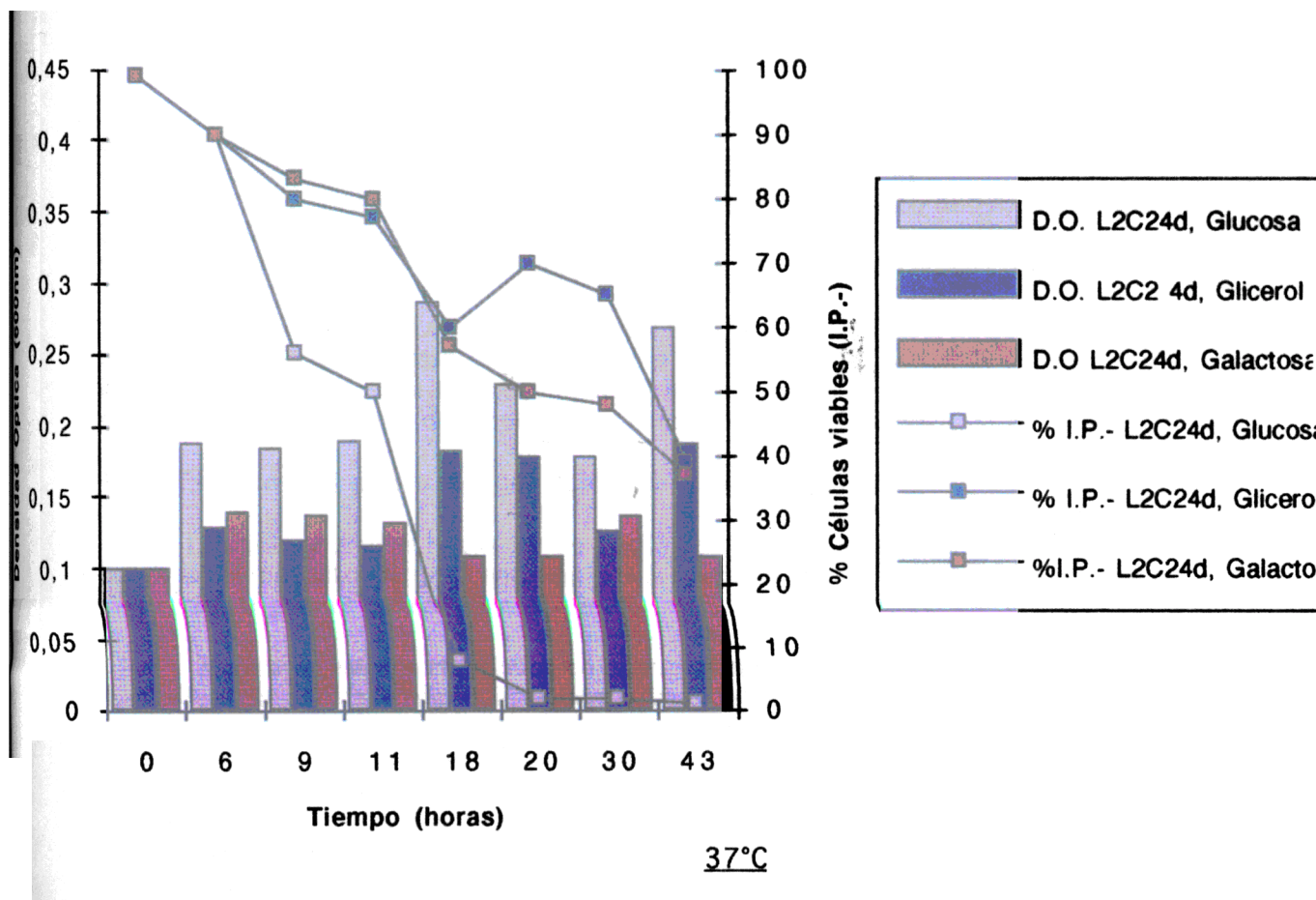
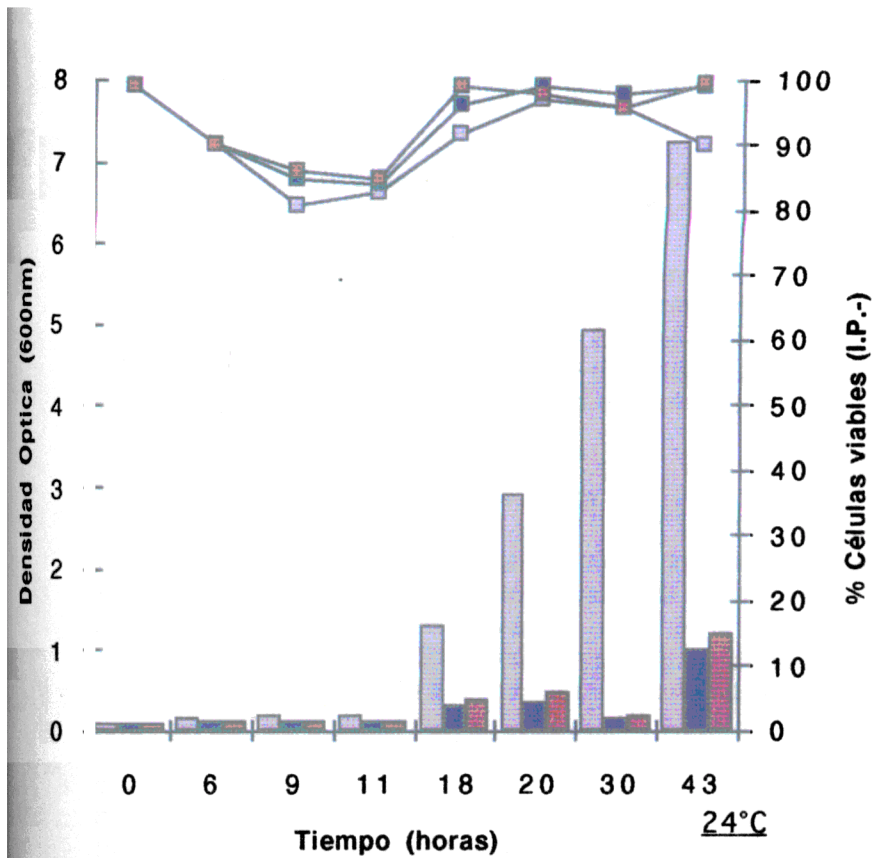


FIGURA 14: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA ESTIRPE MUTANTE EN DISTINTOS AZUCARES
 Tanto el crecimiento como la lisis se ven disminuidos en galactosa y glicerol.



1.2.2.- Crecimiento de la estirpe mutante *lyt 1* en eritromicina.

Se decidió determinar entonces si la falta de crecimiento y de lisis en glicerol era debida a un defecto mitocondrial que fuera el causante de que dicha fuente de carbono no se metabolizara.

Para comprobar este hecho se estudió el fenotipo *Lyt1* en presencia de 0.5 mg/ml de eritromicina, inhibidor de la función mitocondrial en eucariotas (Wheals, 1987), tanto en glucosa como en galactosa.

Tal y como se muestra en la figura 15, en glucosa, se pudo observar el comportamiento habitual de la cepa mutante *lyt 1*, tanto a 24°C como a 37°C, en ausencia y presencia de eritromicina. En galactosa, sin embargo, el crecimiento se ve ralentizado y la lisis disminuida tanto en presencia como en ausencia del antibiótico y de una manera similar a la descrita en el punto anterior.

1.2.3.- Determinación con 2-3-5-trifenil-tetraazolio de la actividad mitocondrial en la cepa L2C24d.

A pesar de que los datos anteriores indicaban que la actividad mitocondrial no estaba implicada en el fenotipo aquí estudiado se decidió confirmarlos con un ensayo que midiera la fosforilación oxidativa.

El trifeniltetraazolio es un reactivo químico que al ser oxidado en la ruta de la fosforilación oxidativa da a las células una coloración roja (Ogur *et al.*, 1957).

Se realizó la prueba tanto a 24°C como a 37°C, usando como referencia una cepa silvestre (control +) y una cepa "petite" (control -). Tras tres horas de incubación pudimos observar que tanto la cepa silvestre como la mutante *lyt 1* habían adquirido una fuerte coloración roja mientras que la cepa deficiente en actividad mitocondrial seguía blanca como al inicio de la prueba.

1.2.4.- Crecimiento de la cepa *lyt 1* en presencia de cicloheximida.

Como la actividad mitocondrial no está implicada en la ausencia de crecimiento y de lisis en fuentes de carbono distintas de glucosa, se llegó a la conclusión que quizás un crecimiento ralentizado pudiera ser la causa de la ausencia de lisis.

Así, se decidió el estudio de la relación lisis/crecimiento activo mediante la incubación de nuestro mutante en cicloheximida a una concentración (10 µg/ml) tal que inhibiera la elongación de las cadenas peptídicas en el ribosoma (Wheals, 1987).

De esta manera, tal y como se indica en la figura 16, una síntesis activa de proteínas es necesaria para que haya lisis a la temperatura restrictiva. Esto podría justificar el hecho de que en todas aquellas situaciones en que el crecimiento se vió ralentizado la lisis se vió disminuida (p.e: crecimiento en glicerol).

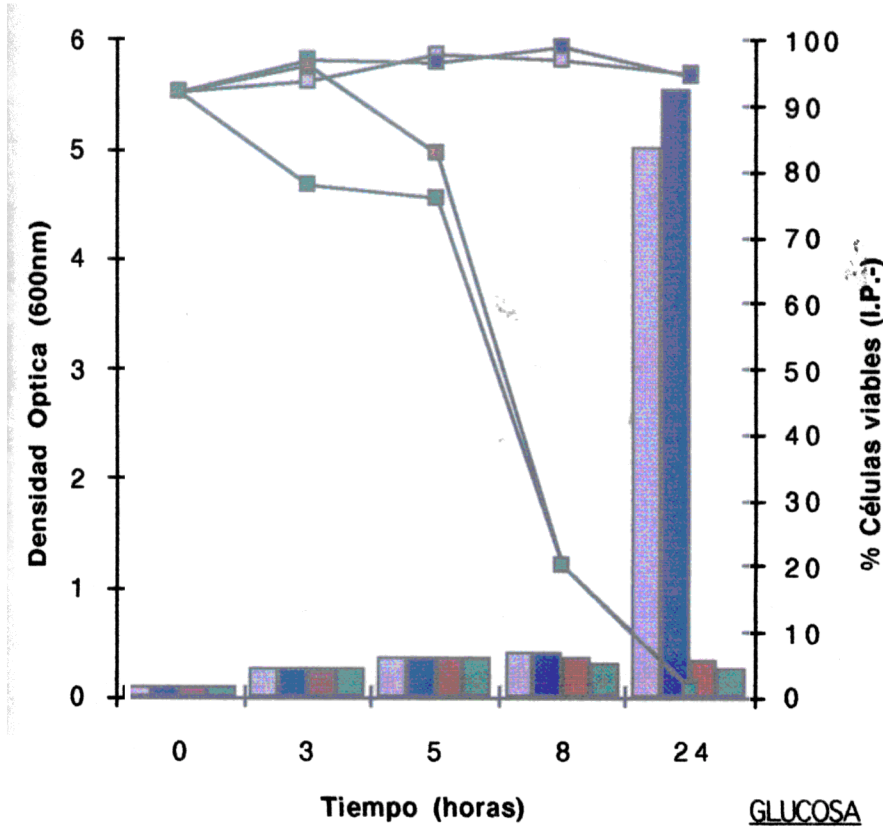
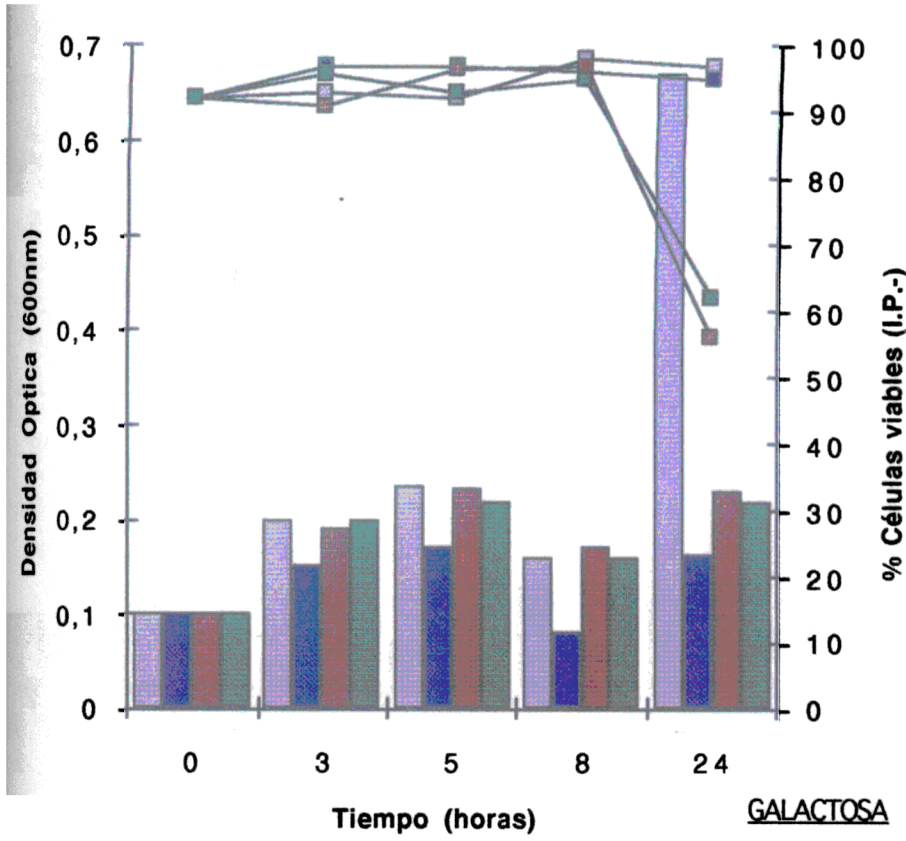
1.3.- Estudio del punto de gemación de la estirpe mutante *lyt 1*.

Las células madre haploides de *Saccharomyces cerevisiae* geman siguiendo un patrón axial respecto de una gemación previa mientras que las cepas diploides lo hacen siguiendo un patrón bipolar (Chant, 1994).

Se hizo un estudio estadístico de la gemación en nuestro mutante, tanto en cepas haploides como en cepas diploides homocigóticas, tanto a 24°C como a 37°C.

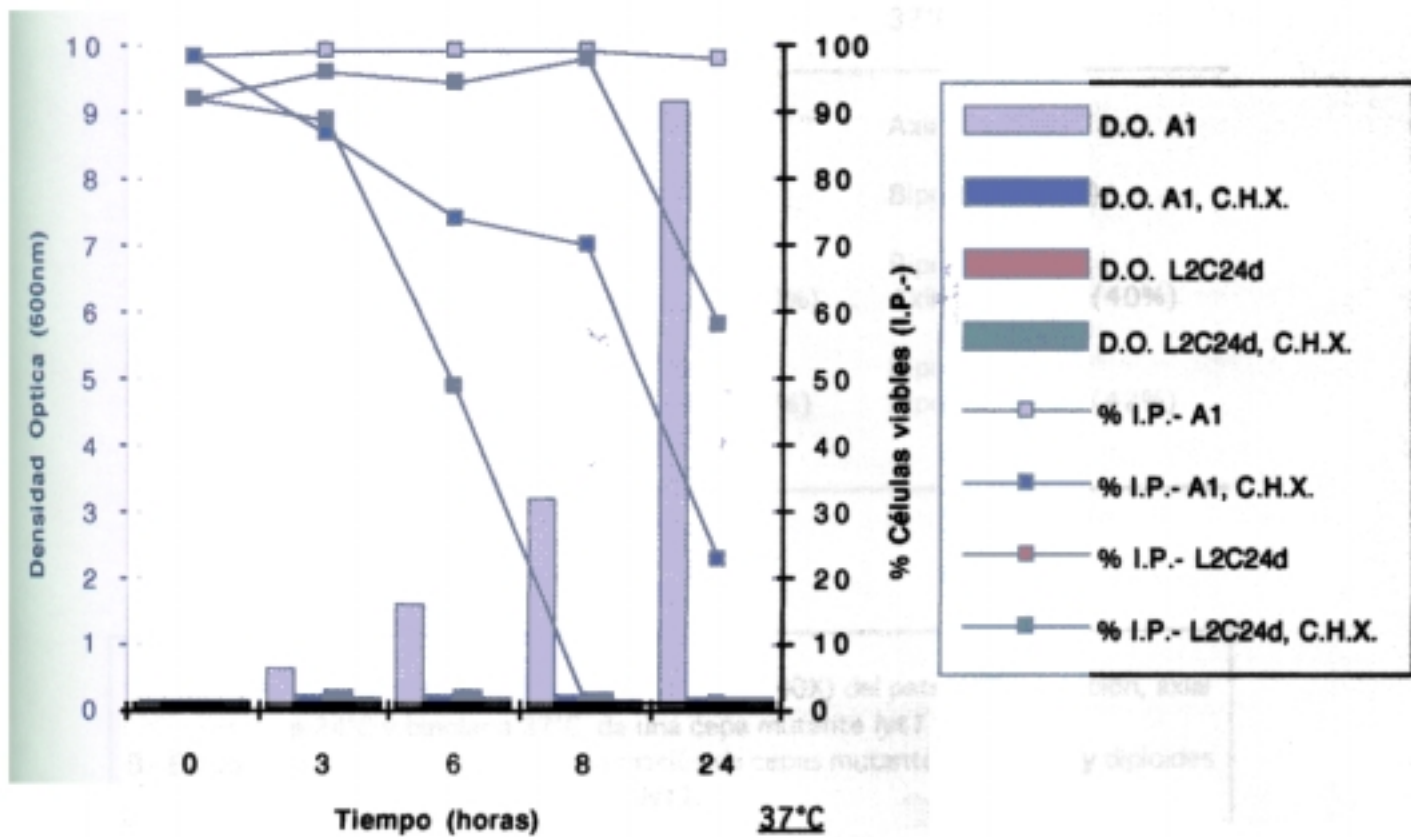
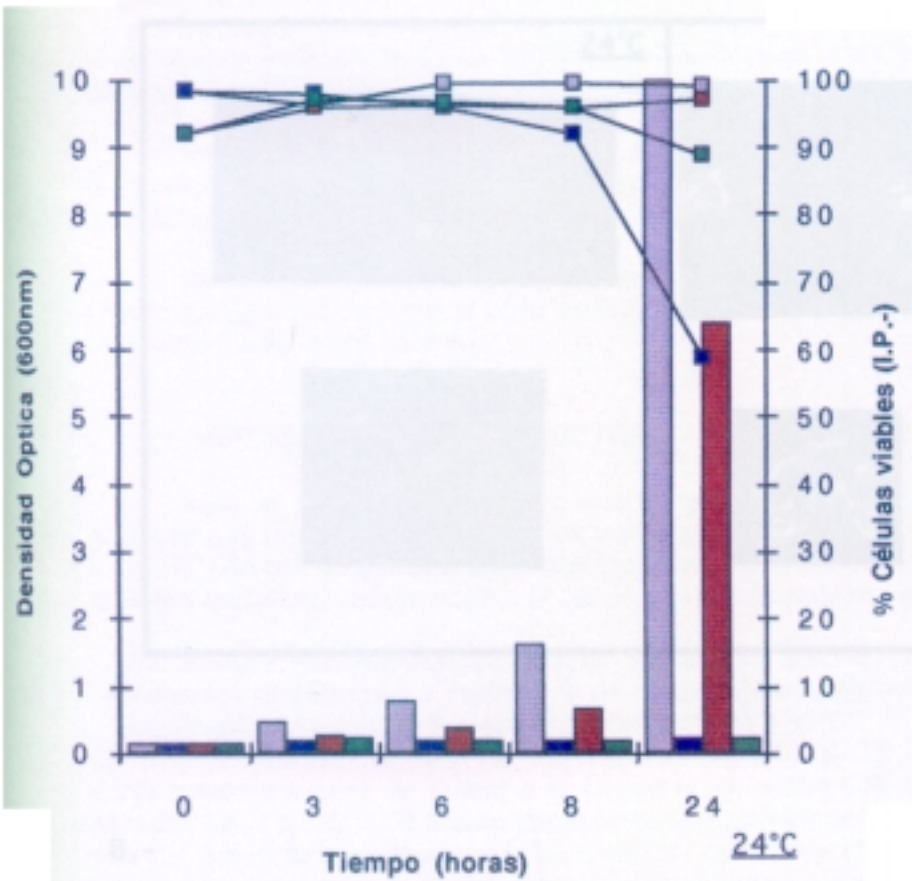
Mientras que las cepas diploides, tanto silvestres como mutantes, se comportan de manera similar a ambas temperaturas, las haploides difieren. La cepa haploide mutante *lyt 1*, a 24°C, gema de manera axial como la cepa silvestre control. Sin embargo, a 37°C, y antes de parar el crecimiento, la cepa mutante haploide inicia mayoritariamente (Figura 17) una gemación bipolar abortada por la detención del ciclo. La cepa silvestre, a 37°C, gema de manera axial.

FIGURA 15: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE CEPA MUTANTE *lyt1* EN GLUCOSA Y GALACTOSA CON 0.5 mg/ml DE ERITROMICINA.
 La presencia del antibiótico no altera el comportamiento del mutante a 37°C en ninguna de las dos fuentes de carbono.

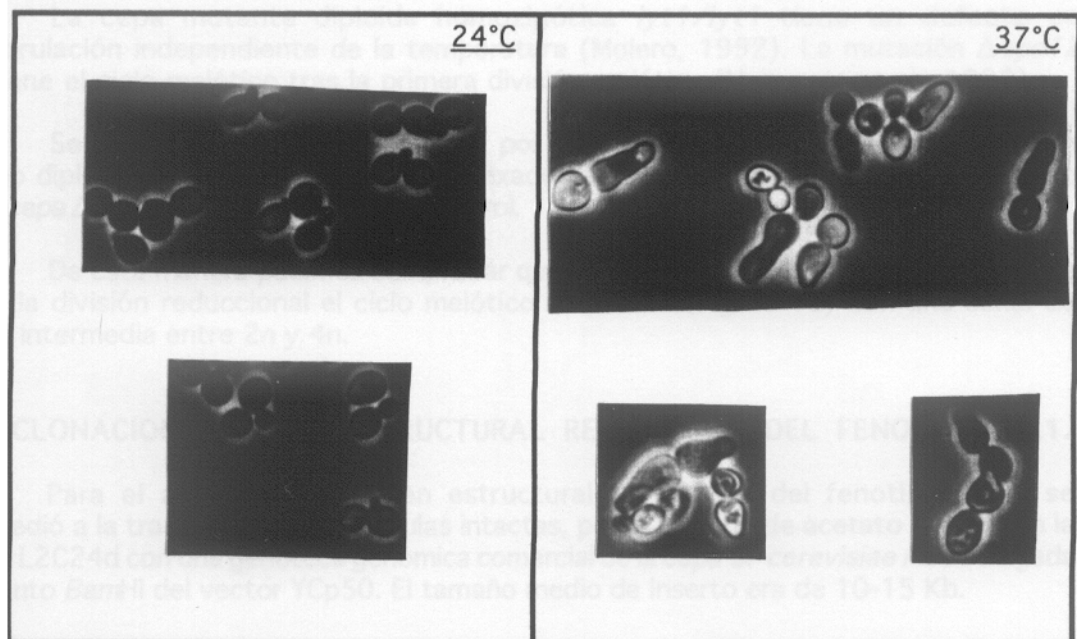


- D.O. L2C24d, 24°C
- D.O. L2C24d, 24°C, E.
- D.O. L2C24d, 37°C
- D.O. L2C24d, 37°C, E.
- %I.P.- L2C24d, 24°C
- %I.P.- L2C24d, 24°C, E.
- %I.P.- L2C24d, 37°C
- %I.P.- L2C24d, 37°C, E.

FIGURA 16: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA CEPA MUTANTE *lyt1* EN PRESENCIA DE 10 μ g/ml DE CICLOHEXIMIDA (CHX)
El antibiótico previene la lisis del mutante a la temperatura no permisiva.



A.-



B.-

CEPA 24°C 37°C

A1 - Haploide-	Axial (> 95%)	Axial (>97%)
lyt1- Haploide-	Axial (100%)	Bipolar (>80%)
Silvestre - Diploide-	Bipolar (70%) Axial /Bipolar (30%)	Bipolar (60%) Axial /Bipolar (40%)
DU ₃ - lyt1/lyt1 - Diploide	Bipolar (50%) Bipolar/Axial (12%) Axial (37%)	Bipolar (57%) Bipolar /Axial (42%)

FIGURA 17: A.- Fotografías de contraste de fases (40X) del patrón de gemación, axial a 24°C y bipolar a 37°C, de una cepa mutante *lyt1* haploide.
B.- Estudio estadístico del patrón de gemación de cepas mutantes haploides y diploides *lyt1*.

1.4.- Estudio del defecto meiótico del diploide homocigótico *lyt1/lyt1*.

La cepa mutante diploide homocigótica *lyt1/lyt1* tiene un defecto en esporulación independiente de la temperatura (Molero, 1992). La mutación $\Delta spo12$ detiene el ciclo meiótico tras la primera división meiótica (Malavasic *et al.*, 1992).

Se decidió hacer un seguimiento, por citometría de flujo, del ciclo meiótico de dicho diploide para determinar el punto exacto en que paraba la esporulación, usando una cepa $\Delta spo12$ homocigótica como control.

De esta manera pudimos comprobar que el DNA se duplicaba normalmente y que tras la división reduccional el ciclo meiótico se paraba (Figura 18) con una señal de DNA intermedia entre $2n$ y $4n$.

2.- CLONACION DEL GEN ESTRUCTURAL REPOSABLE DEL FENOTIPO *Lyt1*.

Para el aislamiento del gen estructural responsable del fenotipo *Lyt1*, se procedió a la transformación de células intactas, por el método de acetato de litio, de la cepa L2C24d con una genoteca genómica comercial de la cepa *S. cerevisiae* AB320 ligada al punto *Bam*HI del vector YCp50. El tamaño medio de inserto era de 10-15 Kb.

7.000 transformantes fueron obtenidos (3.100 eran necesarios para representar el genoma) y replicados en medio sólido para estudiar su capacidad de complementar el defecto de crecimiento del mutante a 37°C. Catorce transformantes (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13 y T63) fueron capaces de crecer a la temperatura restrictiva en medio sólido. Todos excepto T3, T5, T8 y T9 fueron capaces de complementar la lisis al menos en un 50% tras 24 horas de crecimiento a la temperatura restrictiva (límite aleatorio pero que se fijó como criterio para la complementación del fenotipo lítico)

2.1- Estudio de los insertos que portaban los transformantes aislados.

A los transformantes aislados se les extrajo los plásmidos que portaban para ser sometidos a un análisis de restricción preliminar.

Así, se pudo observar que T2 portaba el mismo inserto que T12. Lo mismo ocurría con T63 y T10. Este hecho redujo el número de transformantes a estudiar a ocho (T1, T2, T4, T6, T7, T10, T11 y T13).

Para comprobar que la complementación del fenotipo se debía a la presencia de los plásmidos, éstos se retransformaron y se estudió tanto su capacidad de complementar de nuevo el fenotipo en el ciclo mitótico así como el defecto de esporulación (Figura 19).

Al haber una clara diferencia en la capacidad de complementar la mutación entre los transformantes T2 y T7 y el resto, se decidió estudiarlos con más precisión, pues era posible que portaran el gen estructural cuya deficiencia causaba el fenotipo *Lyt1*.

2.2.- Caracterización fenotípica de las estirpes transformantes T2 y T7.

2.2.1.- Crecimiento a 24°C y a 37°C

Como se muestra en la figura 20, las cepas transformantes T2 y T7 son capaces de crecer a la temperatura restrictiva de manera similar a una cepa silvestre. Existe una clara diferencia de viabilidad, incluso tras 4 horas de incubación a 37°C, entre las cepas transformadas y el mutante original.

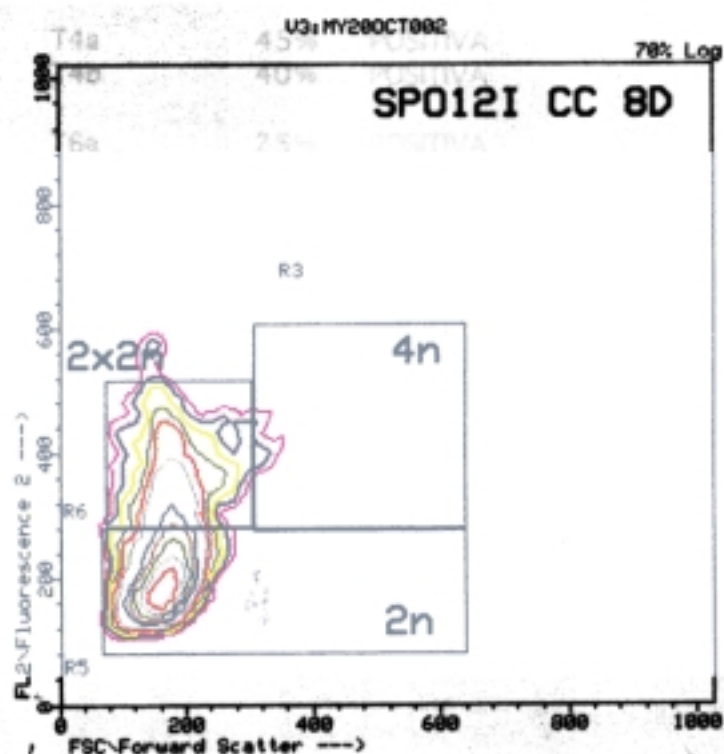
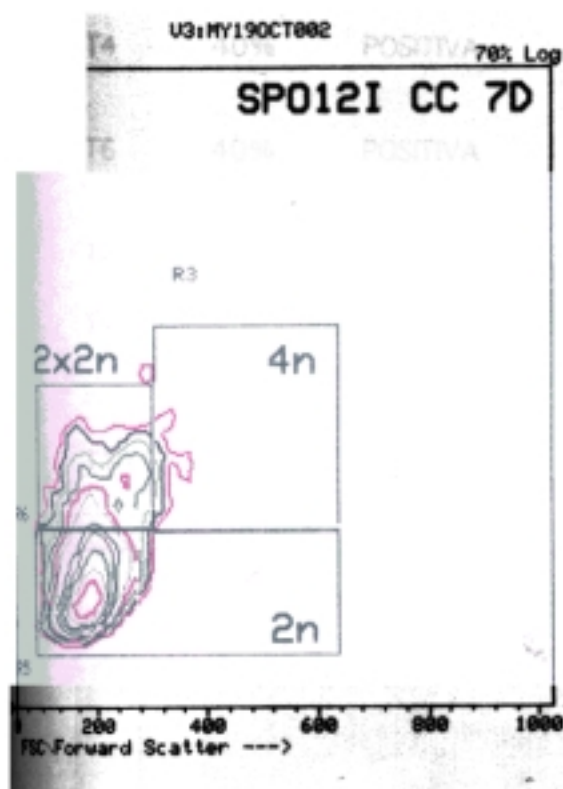
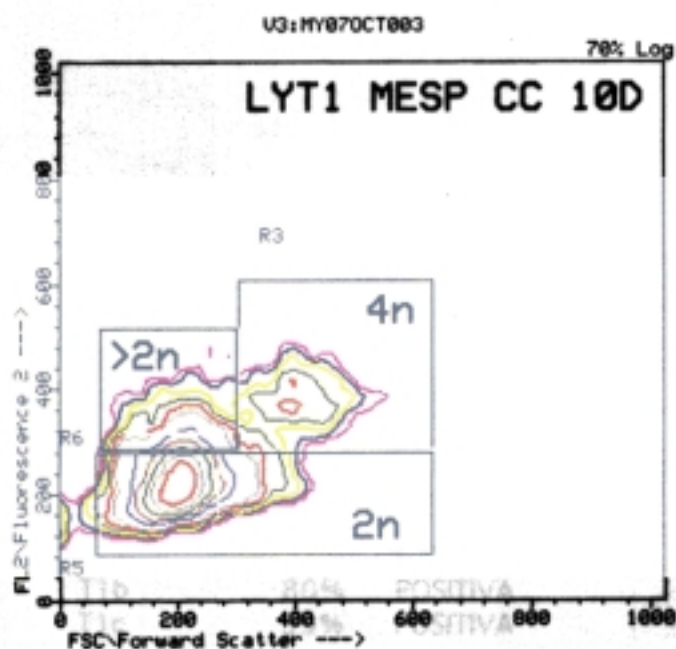
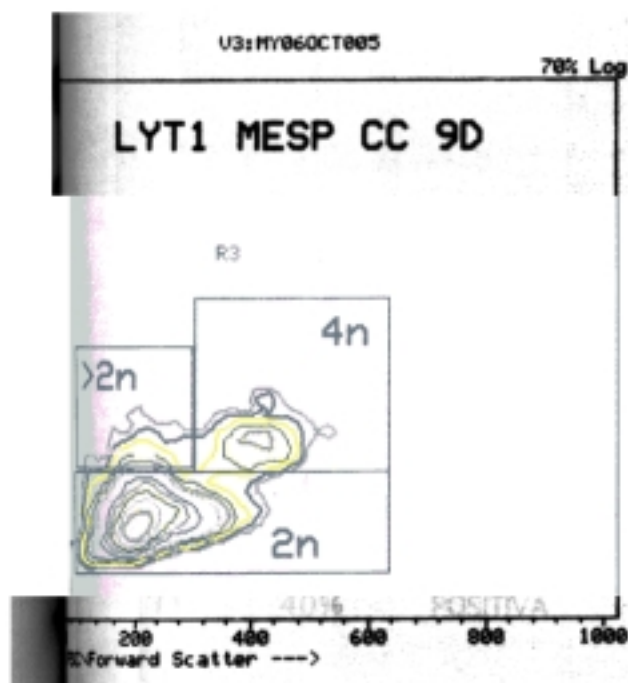
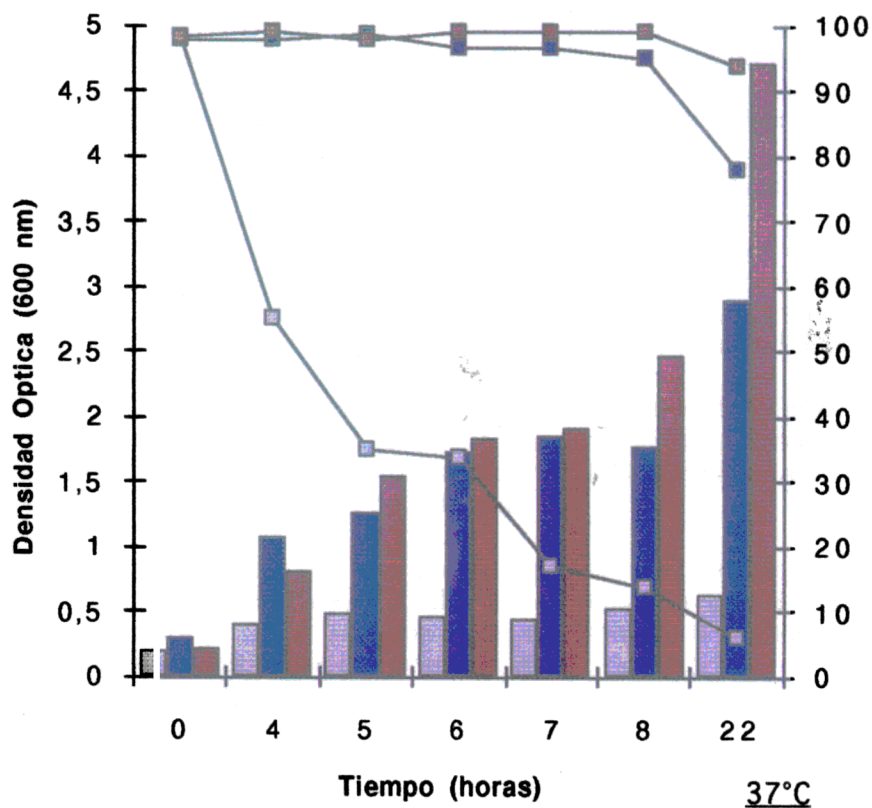
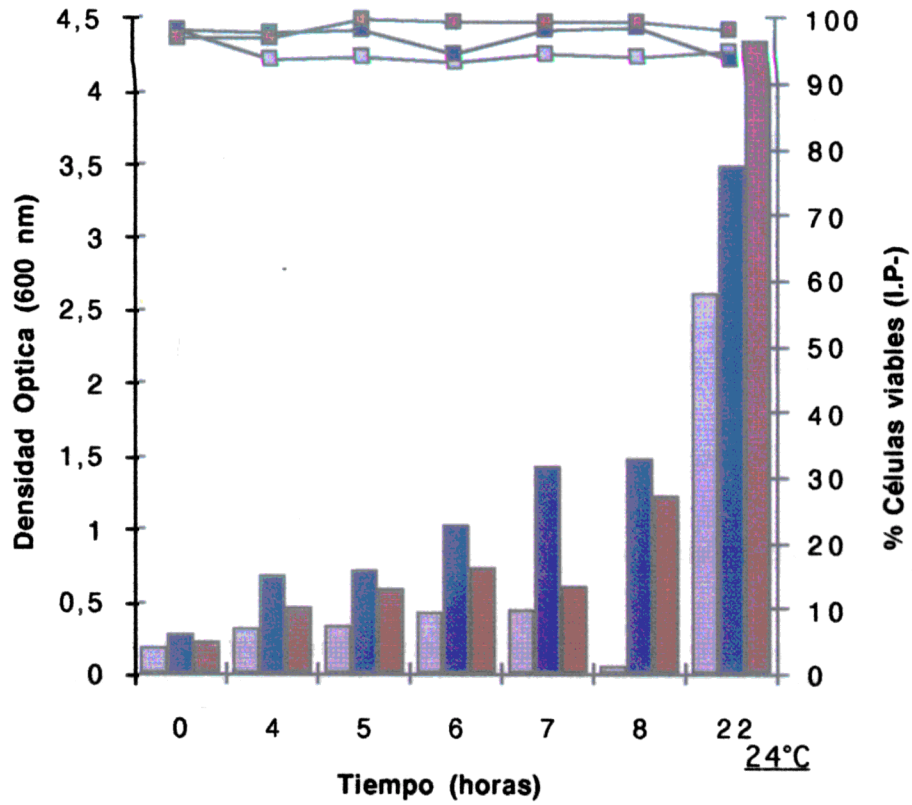


FIGURA 18: Estudio citométrico del ciclo meiótico del diploide homocigótico *lyt1-1/lyt1-1* (9-10 días) y del diploide homocigótico $\Delta spo12/\Delta spo12$ (7-8 días). En la figura, las abscisas representan intensidad de fluorescencia y las ordenadas tamaño relativo (FSC).

CEPA	LISIS	ESPORULACION	RETRANSFORMACION	LISIS	ESPORULACION
T1	40%	POSITIVA	T1a	95%	POSITIVA
			T1b	80%	POSITIVA
			T1c	99%	POSITIVA
T2	10%	POSITIVA	T2a	5%	POSITIVA
			T2b	5%	POSITIVA
T4	40%	POSITIVA	T4a	45%	POSITIVA
			T4b	40%	POSITIVA
T6	40%	POSITIVA	T6a	25%	POSITIVA
			T6b	30%	POSITIVA
T7	15%	POSITIVA	T7a	5%	POSITIVA
T10	45%	POSITIVA	T10a	25%	POSITIVA
			T10b	30%	POSITIVA
T13	45%	POSITIVA	T13a	8%	NEGATIVA
			T13b	40%	NEGATIVA
			T13c	45%	NEGATIVA

FIGURA 19: Esquema de los datos de lisis y esporulación de los transformantes y retransformantes aislados como supresores del fenotipo *Lyt1*

FIGURA 20: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA ESTIR
MUTANTE *lyt1* TRANSFORMADA CON T2 Y T7.



D.O. L2C24d
D.O. L2C24d-T2
D.O. L2C24d-T7
% I.P. L2C24d
% I.P. L2C24d-T2
% I.P. L2C24d-T7

2.2.2.- Morfología celular al microscopio de contraste de fases

Las células de las cepas transformantes, después de ocho horas de incubación a 37°C, presentan una morfología normal, permaneciendo refringentes al igual que la cepa silvestre. Así mismo se puede observar que a 37°C el patrón de gemación en haploides es axial, habiéndose restaurado también este defecto fenotípico del mutante original.

2.2.3.- Esporulación

Ambos plásmidos son capaces de restaurar el ciclo meiótico de una estirpe mutante diploide homocigótica *lyt 1/lyt 1*. Se producen ascas con 4 ascosporas viables, a los cinco o seis días de ser incubados a 24°C en medio sólido de esporulación (de manera similar que una cepa control silvestre).

2.3.- Caracterización de los fragmentos T2 y T7 capaces de complementar la mutación *lyt 1*.

2.3.1.- Determinación del tamaño, mapa de restricción de ambos fragmentos.

Ambos fragmentos fueron tratados con diversas enzimas de restricción obteniéndose, los mapas de restricción y tamaños que se muestran en la figura 21 y 22.

2.3.2.- Determinación del mínimo fragmento del plásmido T7 capaz de complementar la mutación *lyt 1*

A.-Según el mapa de restricción mostrado anteriormente, se decidió hacer la delección del fragmento *NruI -NruI*(Figura 21).

El plásmido resultante, T7N1, fue capaz de complementar tanto el defecto de lisis y defecto en el patrón de gemación a 37°C, como el defecto en el ciclo meiótico. A su vez, el fragmento delecionado fue subclonado en el YCp50. El plásmido resultante, T7N2, no fue capaz de suprimir la lisis del *lyt 1*, ni el defecto en esporulación.

B.- Se continuó la reducción de tamaño del plásmido T7N1 eliminando los fragmentos *XbaI -XbaI*.

Se comprobó la capacidad de complementar el fenotipo *Lyt1* del nuevo plásmido T7N1X1. Así, se hizo ver que el plásmido resultó ser capaz de suprimir el defecto en el ciclo mitótico y el de patrón de gemación aunque no así el defecto en esporulación.

T7N1X2 fue subclonado en el plásmido centromérico pHR70 (el cambio de vector se debió a que el YCp50 no tiene punto de corte para la endonucleasa *XbaI*). La cepa mutante *lyt 1* transformada con T7N1X2 mostró una lisis y un ciclo meiótico similar al del mutante sin transformar.

Cabe resaltar que cuando en el plásmido T7 se deleciona el fragmento T7N1X3 pierde la capacidad de llevar a cabo una esporulación normal en la cepa diploide mutante homocigótica *lyt 1/lyt 1*, aunque sigue manteniendo la capacidad de suprimir el defecto autolítico termosensible que presenta en el ciclo mitótico.

C.- Cualquier intento de reducir más el tamaño de T7N1X1 (p.e: Subclonación de los fragmentos *SaI -SaI*, plásmidos T7N1X1S1, T7N1X1S2 y T7N1X1S3) resultó infructuoso, pues siempre se perdió la capacidad de complementar la lisis a 37°C que poseía el plásmido T7N1X1.

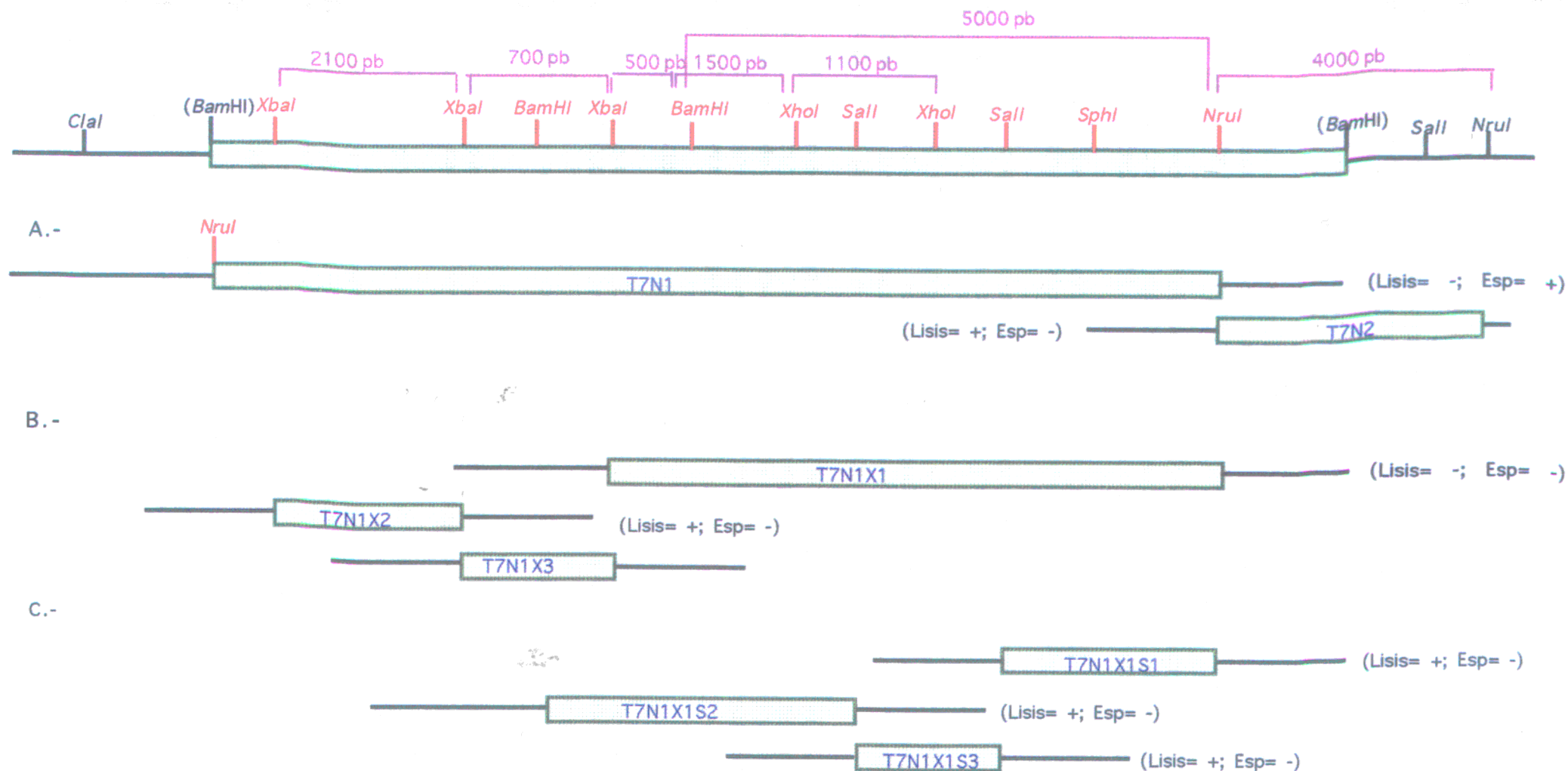


FIGURA 21: MAPA DE RESTRICCIÓN DE T7. Subclonaciones realizadas para la búsqueda del tamaño mínimo capaz de complementar el fenotipo *Lyt1*.

Esp = Esporulación

2.3.3.- Determinación del mínimo fragmento capaz de complementar la mutación *lyt1* del plásmido T2

Estudios anteriores y preliminares mostraron que T2 podía tener fragmentos comunes a T7 por ello, para la realización de la búsqueda del mínimo fragmento de T2 capaz de complementar el fenotipo *Lyt1*, se siguió una pauta similar a la seguida con T7. La mayor diferencia estribó en que, como *NruI* no corta en T2, se comenzó delecionando el fragmento *XbaI* -*XbaI* (Figura 22).

A.- Al estudiar si el plásmido T2X1 era capaz de complementar la fenotipo *Lyt1*, se observó que aunque era capaz de restituir un crecimiento similar al de una cepa silvestre a 37°C, no sucedía lo mismo con la esporulación.

Paradójicamente, cuando en el plásmido T2 se eliminaba el fragmento T2X2 se perdía la capacidad de éste de complementar el defecto en esporulación a la cepa diploide mutante homocigótica *lyt1/lyt1*, sin que sucediera lo mismo con el crecimiento a 37°C.

2.3.4.- Secuenciación de los fragmentos T2X2 y T7N1X3. Secuenciación del fragmento interno *XhoI* -*XhoI* del plásmido T7N1X1.

Dada la inesperada complementación del fenotipo obtenidos en ambos fragmentos T2X2 y T7N1X3 y su similar tamaño (± 700 pb), se decidió secuenciar ambos fragmentos.

La secuencia fue enviada para búsqueda de homologías por el programa FASTA en el banco de datos del EMBL. El resultado de la búsqueda fue una homología de un 100%, en ambos casos, con un fragmento del cromosoma I de *Saccharomyces cerevisiae* que incluye el final del gen *NPK1* y el del gen *ADE1* (Figura 23).

El fragmento *XhoI* -*XhoI* del fragmento T7N1X1, fue también secuenciado. El resultado de la secuencia fue enviado para búsqueda de homologías por el programa FASTA, al banco de datos del EMBL. El resultado de la búsqueda fue una homología del 100% con un fragmento incluido en el gen *CDC15* situado en el cromosoma I de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 23).

2.3.5.- Hibridación de *CDC15* con T7 y T2.

Para comprobar que *CDC15* estaba incluido en T2 y T7, se realizó una hibridación DNA-DNA usando como sonda el fragmento *BamHI* -*BglI* (2700 pb) del plásmido pBS9 (Schweitzer y Philippsen, 1991) que incluía un fragmento interno de *CDC15* sobre una matriz que portaba T2, T7 y pBS9 (control +) digeridos con *SalI* y *ClaI*.

Como se muestra en la Figura 24, la sonda hibridó con T2 y T7, confirmando los resultados que se habían obtenido anteriormente por secuenciación.

2.4.- ¿*CDC15* y *NPK1* reponsables del fenotipo *Lyt1*?

Los datos anteriores parecen indicar que el fenotipo *Lyt1* no sólo se debe a la deficiencia de un solo gen sino a la de dos genes consecutivos, *CDC15* y *NPK1*. Se decidió comprobar este hecho mediante distintos ensayos.

2.4.1.- Estudio del fenotipo de la estirpe diploide heterocigótica *cdc15/lyt1*.

Se contruyó la cepa diploide MY1, con un fondo genético *cdc15/lyt1*. Se estudió su fenotipo a 24°C y a 37°C tanto para el ciclo mitótico como para el meiótico.

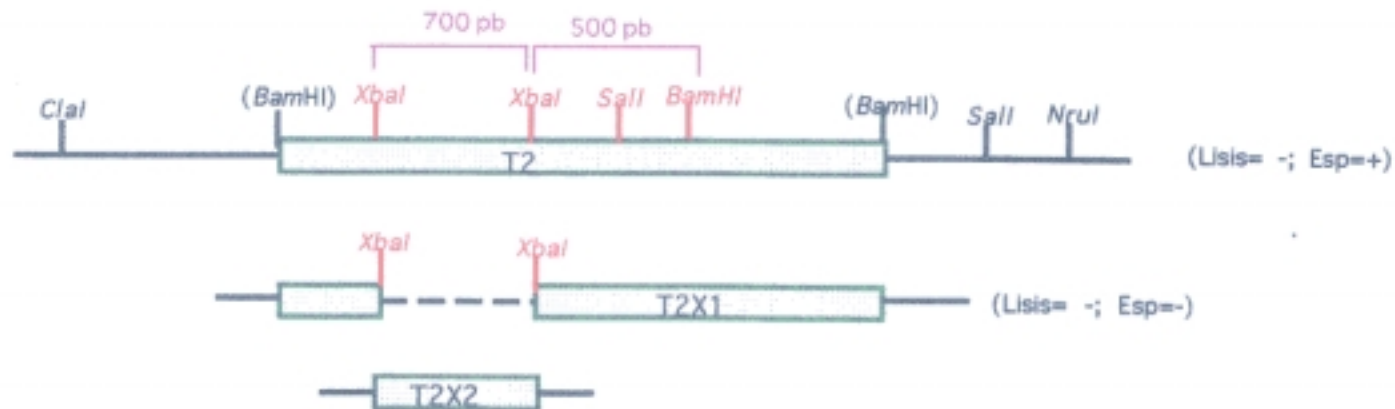


FIGURA 22: MAPA DE RESTRICCIÓN DE T2. Subclonaciones realizadas para la búsqueda del tamaño mínimo capaz de complementar el fenotipo *Lyt1*.

Esp = Esporulación

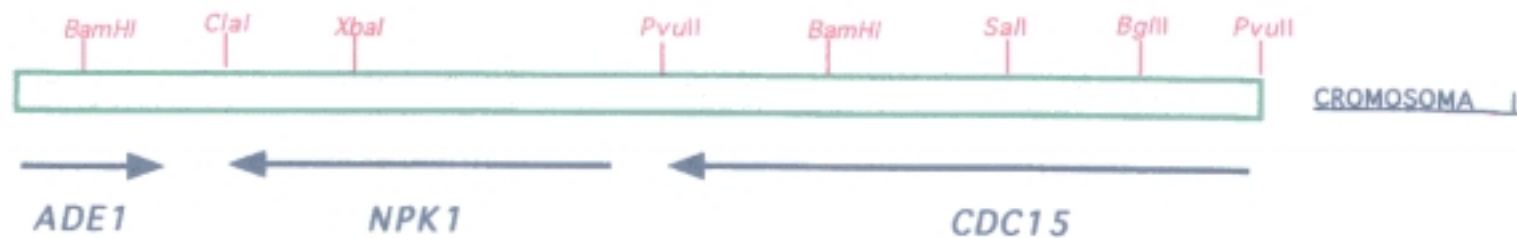
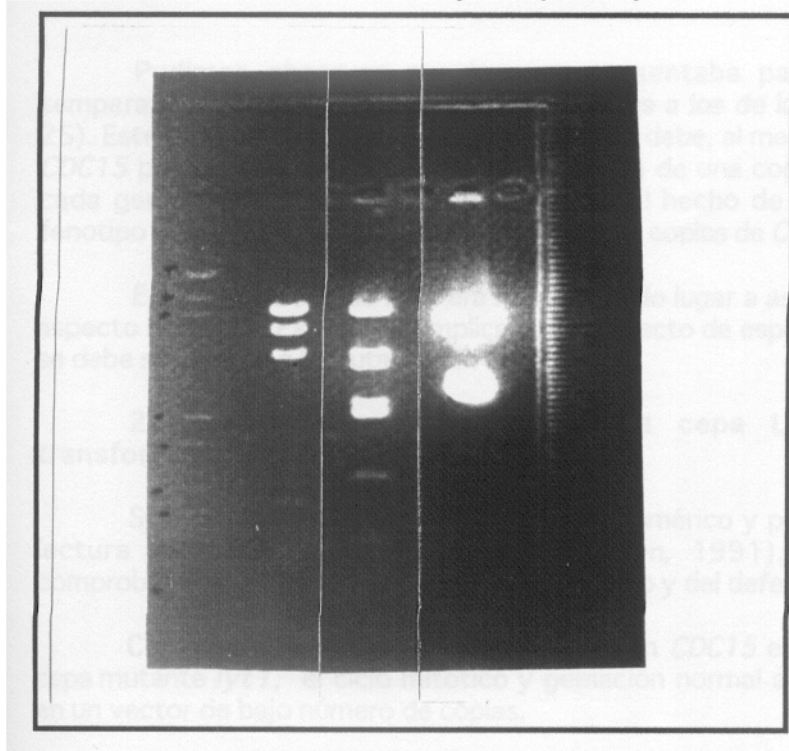


FIGURA 23: ESQUEMA DE LA SITUACIÓN DE LOS GENES *CDC15-NPK1-ADE1* EN EL CROMOSOMA I DE *S. cerevisiae*

λ T2 T7 pBS9 (CDC15)

Digeridos con *Sal* y *Cla*I



λ T2 T7 pBS9 (CDC15)



FIGURA 24: HIBRIDACION DNA - DNA DE T2 y T7 CON CDC15.

Como matriz, se usaron los plásmidos T2 T7 y pBS9 , tal y como se muestran en el gel de agarosa de la fotografía superior.

Como sonda, se usó el fragmento interno *Bam*HI-*Bgl*II (2700 pb) del plásmido pBS9 que incluye un fragmento interno de *CDC15*.

λ= Patrón de pesos moleculares comercial

Pudimos observar que la cepa presentaba parada del ciclo y lisis a la temperatura restrictiva a unos niveles similares a los de la cepa mutante *lyt1* (Figura 25). Este dato confirma que el fenotipo *Lyt1* se debe, al menos, a una mutación en el gen *CDC15* puesto que si no fuera así la existencia de una copia silvestre en el diploide de cada gen supliría la deficiencia del mutado. El hecho de que el diploide presente un fenotipo *Cdc* significa que es defectivo en ambas copias de *CDC15*.

El ciclo meiótico de MY1 era normal dando lugar a ascas con cuatro ascoporas de aspecto normales. Este hecho implica que el defecto de esporulación del mutante *lyt1* no se debe solamente a la mutación en *CDC15*.

2.4.2.- Estudio fenotípico de la cepa L2C24d (haploide *lyt1*) transformada con el gen *CDC15*

Se transformó el plásmido pBS9, centromérico y portador del marco abierto de lectura del *CDC15* (Schweitzer y Philippsen, 1991), en la cepa L2C24d para comprobar la complementación del fenotipo lítico y del defecto en el patrón de gemación.

Como se muestra en la figura 25, el gen *CDC15* es capaz de restaurar, en una cepa mutante *lyt1*, el ciclo mitótico y gemación normal a 37°C, incluso transformado en un vector de bajo número de copias.

En este punto cabe destacar, como hemos indicado antes, que *CDC15* (fragmentos T2X1 y T7N1X1) no es capaz de complementar el defecto meiótico de la cepa diploide mutante homocigótica *lyt1/lyt1*, hecho que se confirmó con la transformación del plásmido pBS9 en este diploide.

2.4.3.- Estudio fenotípico de la cepa DU3 (diploide homocigótico *lyt1/lyt1*) transformada con el gen *NPK1*

Se subclonó el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI que incluye tanto el promotor como el marco abierto de lectura del gen *NPK1* (Figura 23) en el vector centromérico pHR70 para transformar la construcción en el diploide mutante homocigótico *lyt1/lyt1* y poder así estudiar el fenotipo de la cepa transformada.

Respecto al ciclo mitótico, la copia extragenica de *NPK1* no es capaz de suprimir el fenotipo *Lyt1*. Así pues, la cepa transformada se lisa a 37°C, con un patrón de gemación anormal, en un porcentaje similar al control sin transformar (Figura 26).

En cuanto al ciclo meiótico, el *NPK1* extragénico es capaz de restituir una esporulación normal, tanto en medio sólido como en líquido.

2.4.4.- Estudio del nivel de expresión de los genes *CDC15* y *NPK1* en una cepa mutante *lyt1*.

Para saber si el nivel de expresión de *CDC15* y de *NPK1* estaba disminuido en la cepa mutante *lyt1* en comparación con una cepa silvestre, decidimos hacer un estudio de la expresión midiendo la cantidad de RNA que de ambos genes había en la cepa mutante.

Para ello se hizo una hibridación RNA-DNA (técnica de "Northern") usando como matriz el RNA total de la estirpe mutante *lyt1* y de la cepa silvestre S288C, y como sonda el fragmento *Sal*I-*Xba*I (3320 pb) del inserto T7. Dicha sonda incluye el fragmento 3' del *CDC15* y el 5' del *NPK1*. Como patrón interno de expresión, se hibridó con una sonda de 1.75 Kb (*Hind*III-*Bam*HI) que incluye al gen *ACT1* de *S. cerevisiae*.

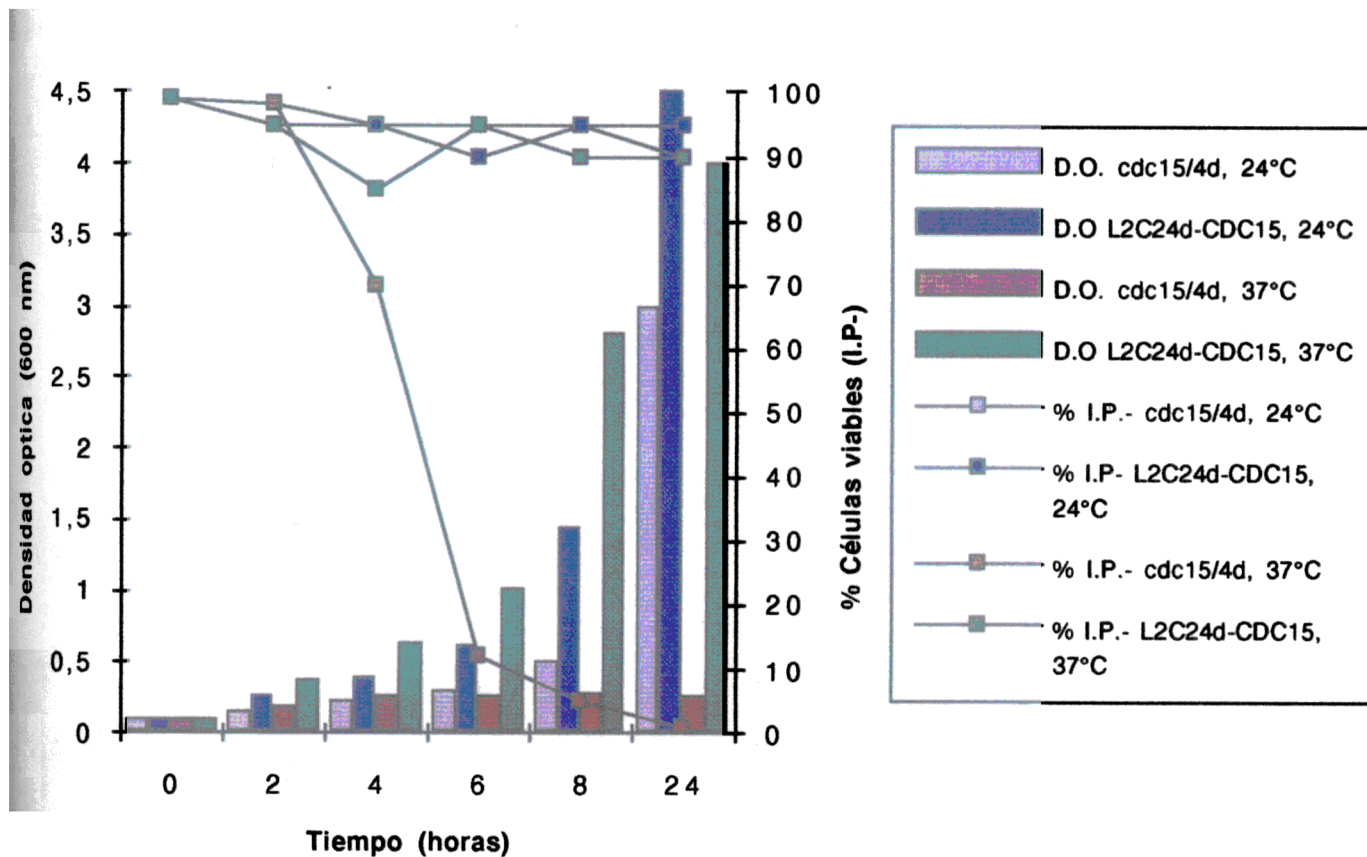


FIGURA 25: Estudio del fenotipo de la cepa diploide heterozigótica *cdc15/lyt1*, así como el de la estirpe mutante *lyt1* transformada con *CDC15*.

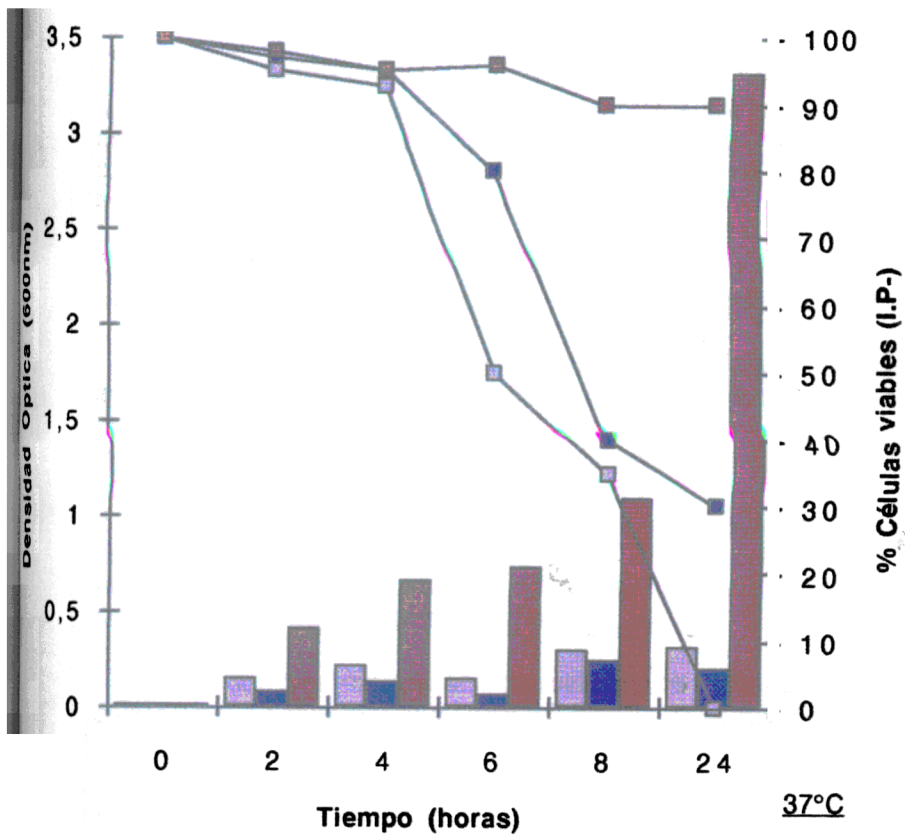
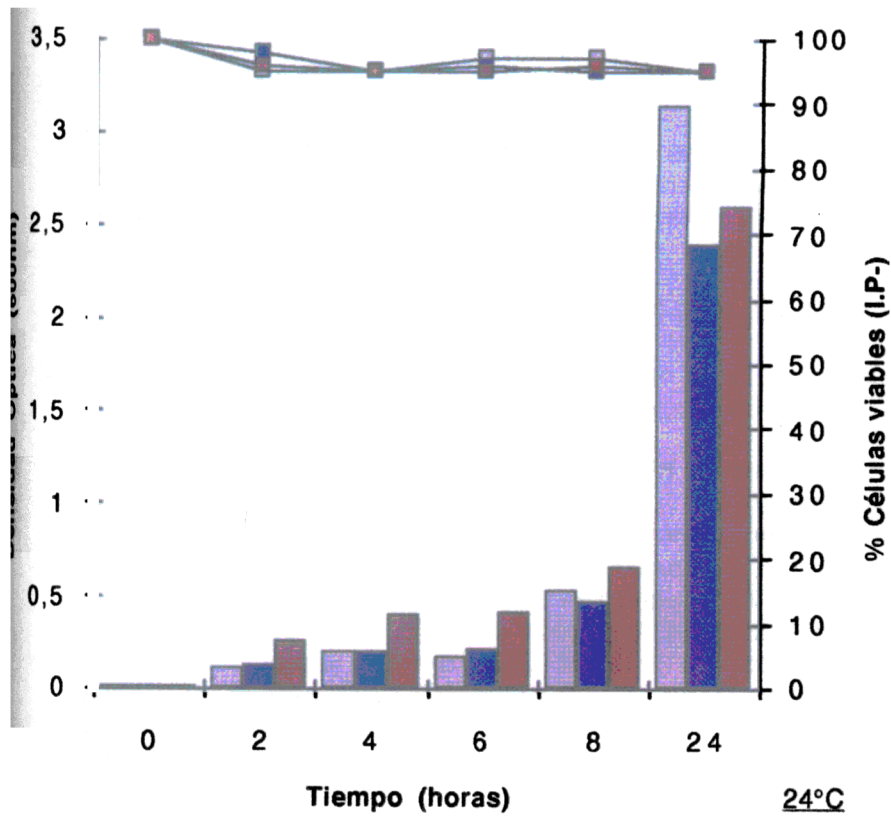


FIGURA 26: Estudio del fenotipo de la cepa mutante *lyt1* transformada con *NPK1*

Como se muestra en la figura 27, la expresión de dichos genes se encuentra claramente disminuida, la banda es apenas perceptible, en nuestra cepa en comparación con una cepa silvestre (banda claramente visible).

2.5.- RESCATE ALELICO DEL GEN *CDC15* DE LA CEPA MUTANTE *lyt1*

Para caracterizar la mutación que en el *lyt1* causaba el fenotipo de parada y lisis en el ciclo mitótico se rescató el alelo mutado del gen *CDC15* de la cepa L2C24d.

Para ello se subclonó el gen *CDC15* silvestre (fragmento *PvuII*-*PvuII* del plásmido pBS9) (Schweitzer y Philippsen, 1991), en el punto *NruI* del plásmido integrativo Ylp5. Esta construcción se transformó linealizada con *BglI* (316 pb) en la cepa mutante, tal y como se muestra en la figura 28.

A los transformantes obtenidos, se les extrajo el DNA genómico que fue cortado con las enzimas *PvuII* y *SphI*. El corte con *PvuII* rescataría el marco abierto de lectura *cdc15(lyt1)* bajo el promotor *CDC15* silvestre. El corte con *SphI* rescataría el marco abierto de lectura *CDC15* silvestre bajo la dirección del promotor *cdc15(lyt1)*. El producto de la restricción fue ligado y transformado en *E. coli*. Los transformantes crecieron bajo una selección con ampicilina. Sólo aquellos fragmentos que al ligarse hubieran incluido el vector (Figura 28), serían capaces de expresar la β -lactamasa responsable de la resistencia a ampicilina. Tras amplificar en *E. coli* ambas construcciones, se subclonaron en un vector centromérico de *S. cerevisiae* (YCp50). Después se comprobó su funcionalidad en la cepa L2C24d.

De esta manera se pudo comprobar que la construcción promotor *cdc15(lyt1)*-ORF *CDC15*(silvestre) era capaz de complementar el defecto en el ciclo mitótico de la estirpe mutante *lyt1* (Figura 29). Predeciblemente, la quimera constituida por el promotor *cdc15*(silvestre) - ORF *cdc15(lyt1)* no fue capaz de complementar dicho fenotipo.

2.5.1.- Estudio de lisis y esporulación del diploide heterozigótico *cdc15(lyt1) / CDC15* (integrado en un fondo genético *lyt1*).

Se construyó a partir de la cepa haploide donde se había integrado el *CDC15* por apareamiento con una cepa haploide *lyt1* del tipo sexual opuesto (L2C26b) y posterior micromanipulación, un diploide con un fondo genético *lyt1* que portaba, integrada en su genoma, una copia de un gen *CDC15* silvestre.

Como se muestra en la figura 29, esta cepa creció de manera normal y no se apreció una lisis significativa a 37°C, comportándose igual que el diploide heterozigótico. Este resultado nos indica que una sola copia silvestre de *CDC15* es suficiente para complementar el fenotipo *lyt1*.

También se estudió el ciclo meiótico de dicho diploide. En medio de esporulación sólido, tras 13 días de incubación a 24°C, no se observó ninguna espora.

2.6.- RESCATE ALELICO DEL GEN *NPK1* DE LA ESTIRPE MUTANTE *lyt1*

Para caracterizar la mutación que en el fenotipo *lyt1* causaba deficiencia en esporulación, se rescató el alelo mutado del gen *NPK1* de la cepa L2C24d.

Para ello se subclonó el fragmento *BamHI*-*BamHI* del plásmido T7 que incluye todo el marco abierto de lectura y el promotor del gen *NPK1*, en el punto *BamHI* del vector integrativo Ylp5. Esta construcción se transformó linealizada con *XbaI* (958 pb) en la cepa mutante, tal y como se muestra en la figura 30.

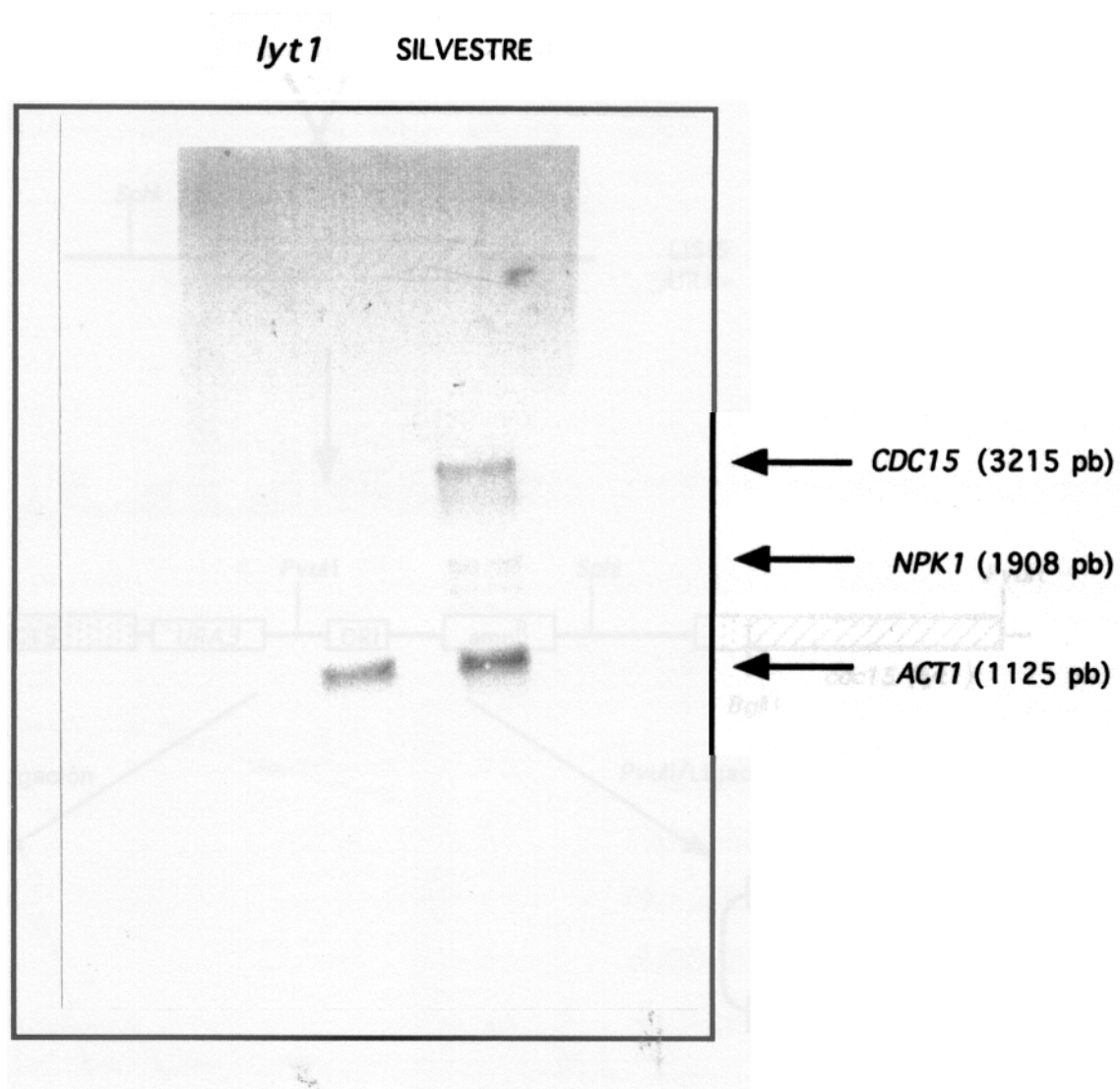


FIGURA 27: HIBRIDACION RNA-DNA. Como matriz, se usó el RNA total de la cepa L2C24d (*lyt1*) y el de la cepa S288C. Como sonda, se usó el fragmento *SalI* -*XbaI* (3300 pb) del inserto T7 que incluye los genes *CDC15* y *NPK1*.

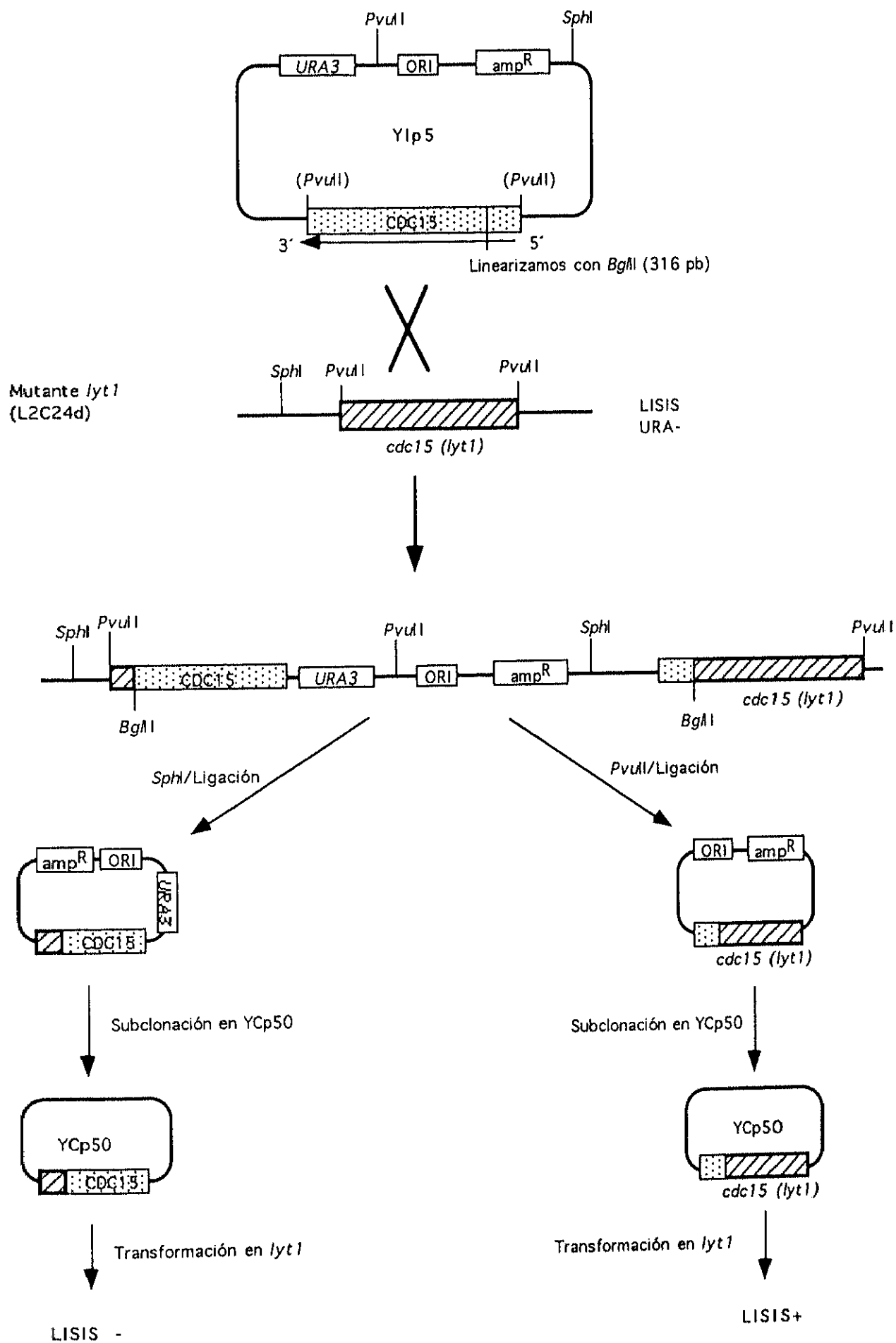
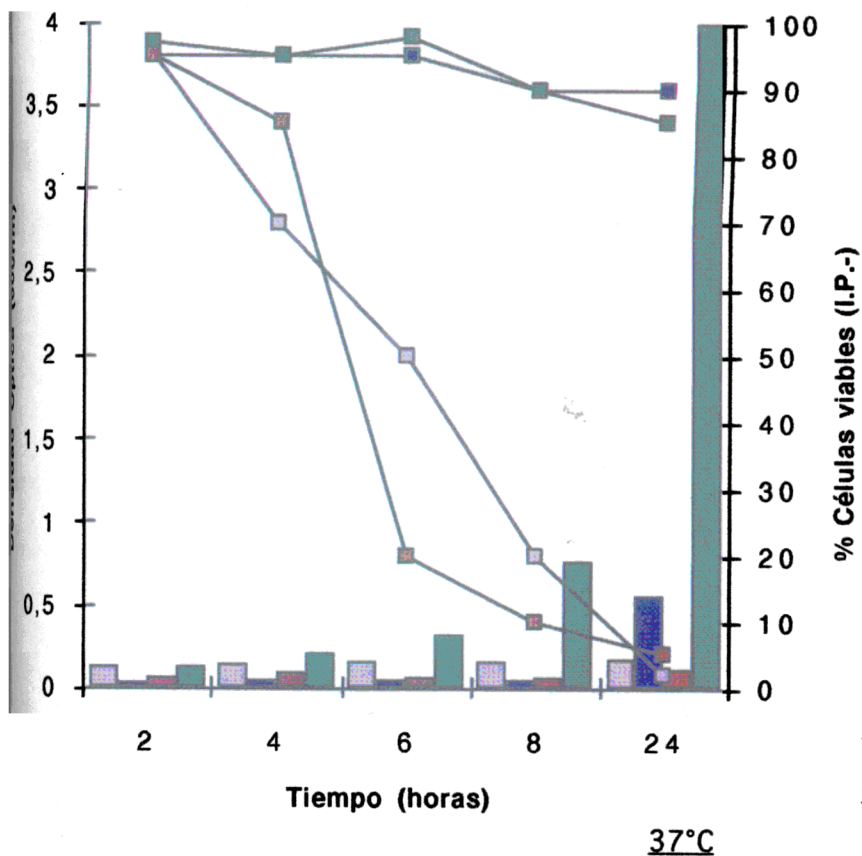
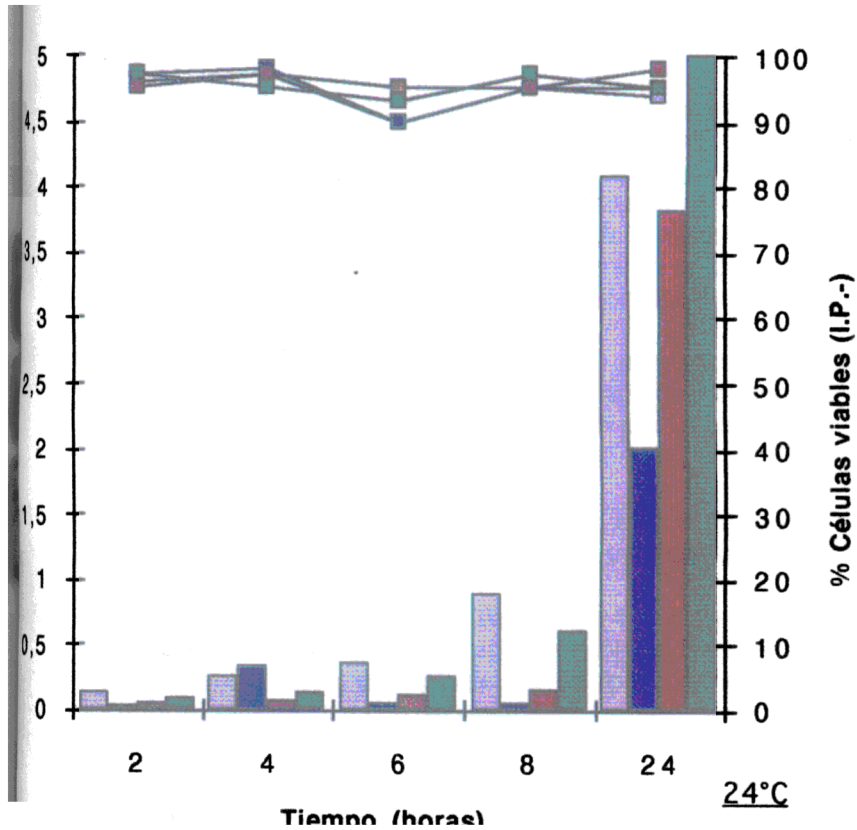


FIGURA 28 : RESCATE DEL ALELO *cdc15* DE LA ESTIRPE MUTANTE *lyt1*

FIGURA 29 : Estudio de viabilidad inferida en la estirpe mutante *lyt1* por las contrucciones derivadas del rescate alélico de *CDC15*



Construcción 1 => YCp50-Promotor *CDC15* (*lyt1*)- O.R.F *CDC15*.

Construcción 2 => YCp50-Promotor *CDC15*- O.R.F *CDC15* (*lyt1*).

MY20 => MATa/MAT α , *CDC15/cdc15* en un fondo genético *lyt1*

A los transformantes obtenidos que portaban una copia del gen *NPK1* silvestre se les extrajo el DNA genómico que fue cortado con los enzimas *HindIII* y *SaI*. El corte con *HindIII* rescataría el extremo 5' del gen *npk1(lyt1)* (1-958 pb) unido al extremo 3' silvestre. El corte con *SaI* rescataría el extremo 3' del gen (958-1048 pb) unido al extremo 5' silvestre. El producto de la restricción fue ligado y transformado en *E. coli*. Los transformantes crecieron bajo una selección con ampicilina. Sólo aquellos fragmentos que al ligarse hubieran incluido el vector (Figura 30), serían capaces de expresar la β -lactamasa responsable de la resistencia a ampicilina. Tras amplificar en *E. coli* ambas construcciones, se subclonaron en un vector centromérico de *S. cerevisiae* (YCp50). Después se comprobó su funcionalidad en una cepa homocigótica *lyt1/lyt1*.

De esta manera se observó que el rescate del extremo 3' del gen *npk1(lyt1)* unido al 5' silvestre fue capaz de complementar el defecto de esporulación obteniéndose ascosporas, tras 7 días de incubación en medio sólido.

2.6.1.- Estudio de lisis y esporulación del diploide heterocigótico *npk1(lyt1)/NPK1* (integrado en un fondo genético *lyt1*).

Se construyó a partir de la cepa haploide donde se había integrado el *NPK1* por apareamiento con una cepa haploide *lyt1* del tipo sexual opuesto (L2C26b) y posterior micromanipulación, un diploide con un fondo genético *lyt1* que portaba, integrada en su genoma, una copia de un gen *NPK1* silvestre.

Como se muestra en la figura 31, esta cepa creció de manera similar al mutante original apreciándose una lisis significativa a 37°C. Este resultado nos indica que una sola copia silvestre de *NPK1* no revierte el defecto del ciclo mitótico de *lyt1*.

También se estudió el ciclo meiótico de dicho diploide. En medio de esporulación sólido, tras 5 días de incubación a 24°C, se observó una esporulación normal observándose en el cultivo ascas con cuatro ascosporas.

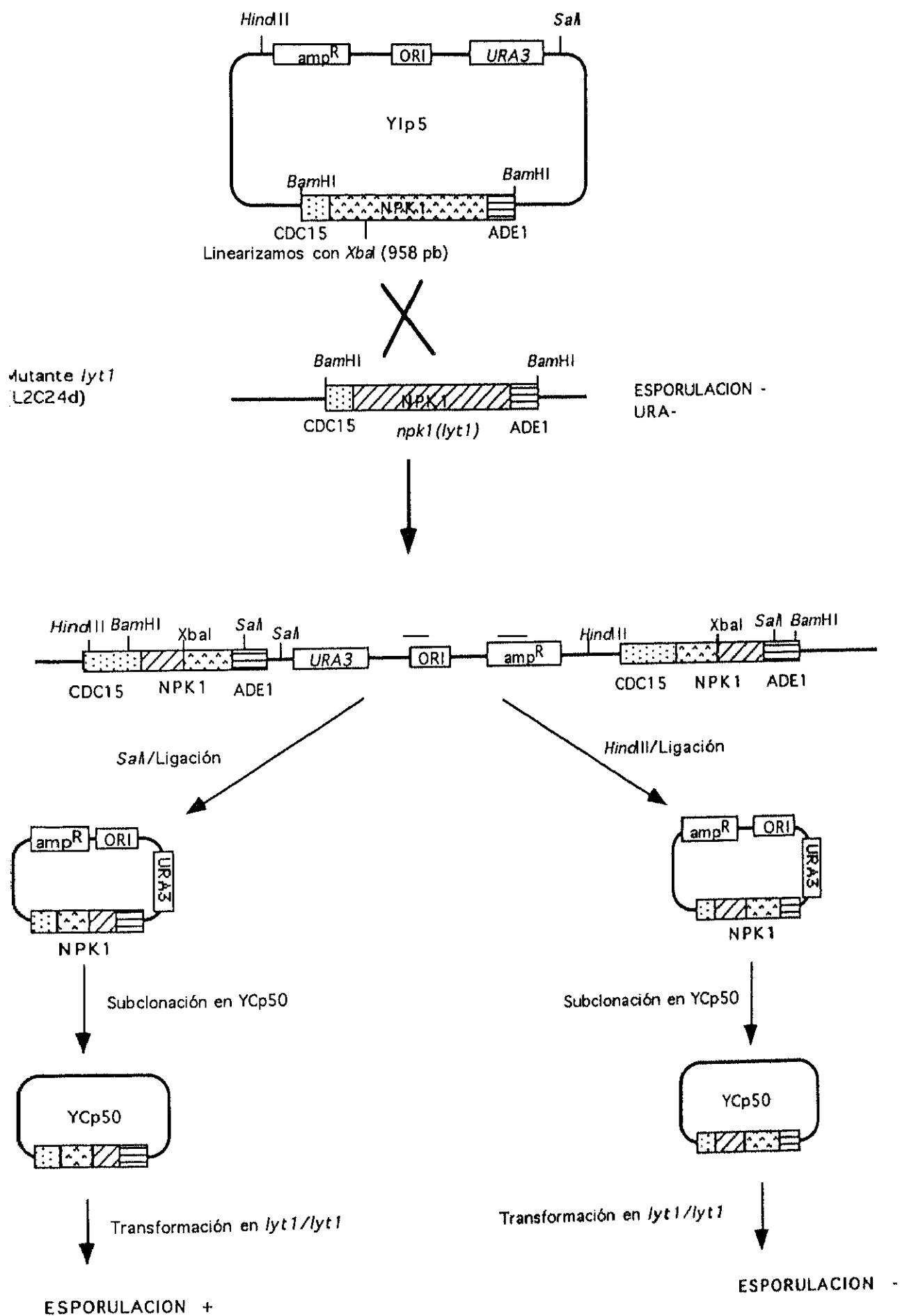
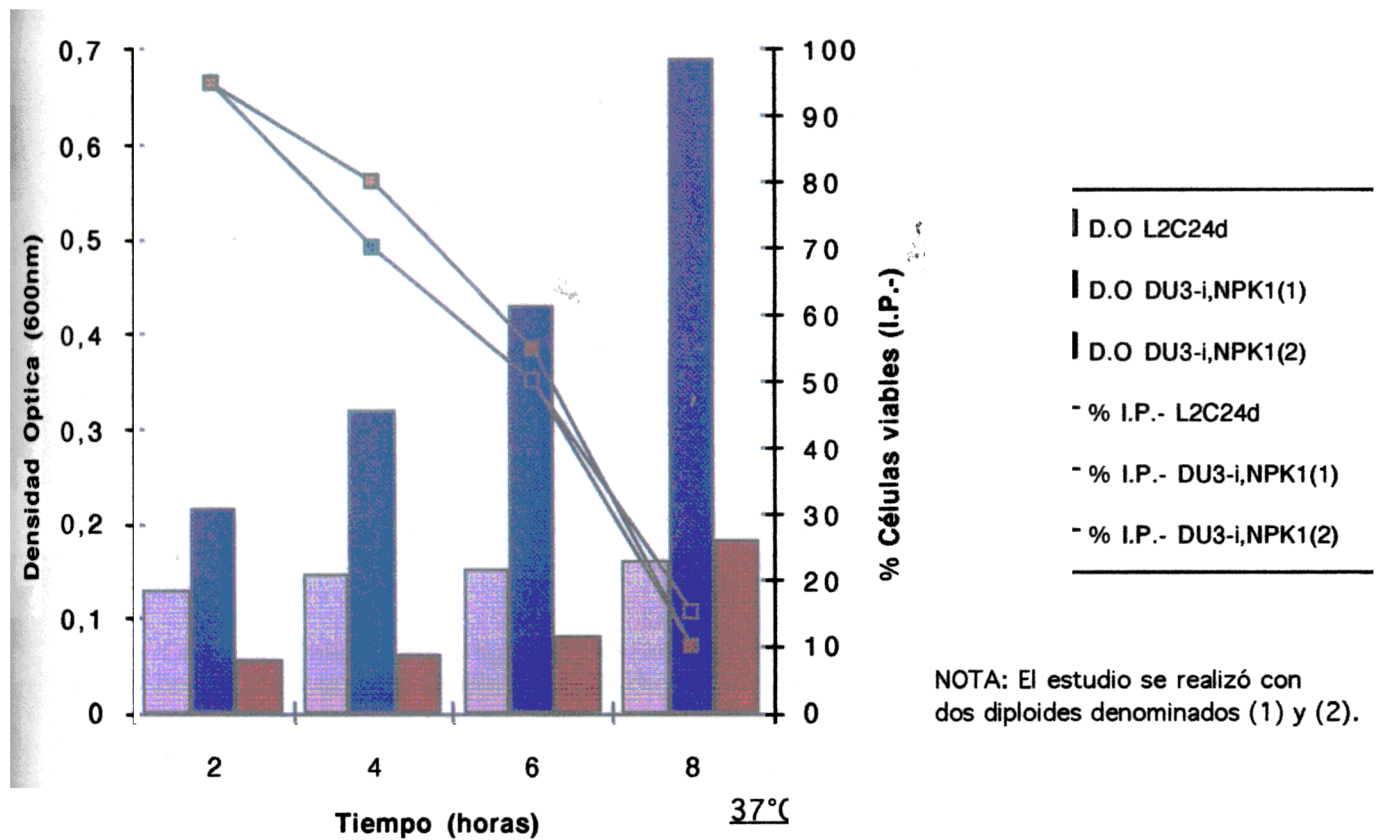
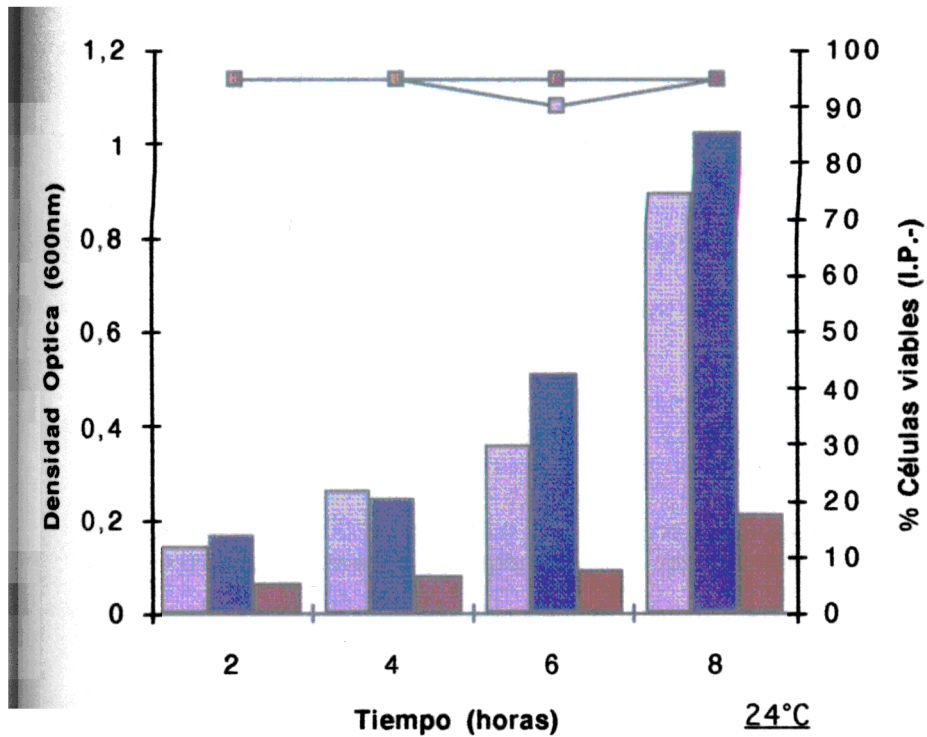


FIGURA 30: RESCATE DEL ALELO *npk1* DE LA ESTIRPE MUTANTE *lyt1*.

FIGURA 31: ESTUDIO DE VIABILIDAD DE UNA CEPA DIPLOIDE HOMOLOGICA *lyt1* QUE PORTA UNA COPIA INTEGRADA DE *NPK1*.



3.- CARACTERIZACION DE GENES HETEROLOGOS SUPRESORES DEL FENOTIPO *Lyt1*.

3.1.- CLONACION DEL GEN *slt1* (*Schizosaccharomyces lyt 1*) DE *Schizosaccharomyces pombe*.

Se transformó la cepa *lyt 1* L2C24d, por el método de acetato de litio, con una genoteca de cDNA de *Schizosaccharomyces pombe* ligada al vector episómico pDB20, bajo la expresión del promotor constitutivo ADH de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tras 24 horas a 24°C, los transformantes se incubaron directamente a 37°C. Sólo obtuvimos una colonia capaz de crecer en placa a esta temperatura, que contenía el plásmido que portaba el inserto que denominamos "TS1".

3.1.1.- Caracterización del fenotipo conferido a la cepa mutante *lyt 1* por TS1

Como se muestra en la figura 32, la cepa transformante TS1 es capaz de crecer parcialmente a la temperatura restrictiva. La lisis es parcialmente complementada llegando a ser de un 40-50% tras 6-8 horas de incubación a 37°C.

Respecto al ciclo meiótico TS1 es capaz de suprimir el defecto de esporulación puesto que se obtuvieron ascosporas tras 5 días de incubación en medio de esporulación a 24°C.

Ambos resultados son debidos al plásmido que portaba a TS1 puesto que se repitieron tras la retransformación del plásmido aislado originalmente.

3.1.2.- Secuenciación del gen *slt1*

El estudio de TS1 nos reveló que portaba un inserto de 1700 pb aproximadamente.

La secuenciación de dicho inserto nos descubrió la existencia de un marco abierto de lectura de 433 aminoácidos. El gen fue denominado *slt1* (*Schizosaccharomyces lyt 1*) (Código de acceso E.M.B.L. : X86009)(Figura 33).

La búsqueda de homologías de *slt1* o de *Slp1p* ha resultado infructuosa hasta el momento actual, no encontrándose nada similar en cuanto a secuencia o motivos en los bancos de datos internacionales (EMBL).

3.1.3.- Estudio de la expresión de *slt1*

Se decidió, en este punto, estudiar si *slt1* era expresado en cepas haploides de *Schizosaccharomyces pombe*, a pesar de complementar un defecto en esporulación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se comprobó la transcripción del fragmento clonado, mediante una hibridación RNA-DNA, usando como matriz el RNA total de dos cepas de tipo sexual opuesto de *Schizosaccharomyces pombe* (SM1 y SM2) y como sonda la totalidad del marco abierto de lectura de *slt1*.

Como se muestra en la figura 34 el Northern nos indicó que *slt1* se expresa en cepas haploides y que en efecto se trata de un gen de *Schizosaccharomyces pombe*.

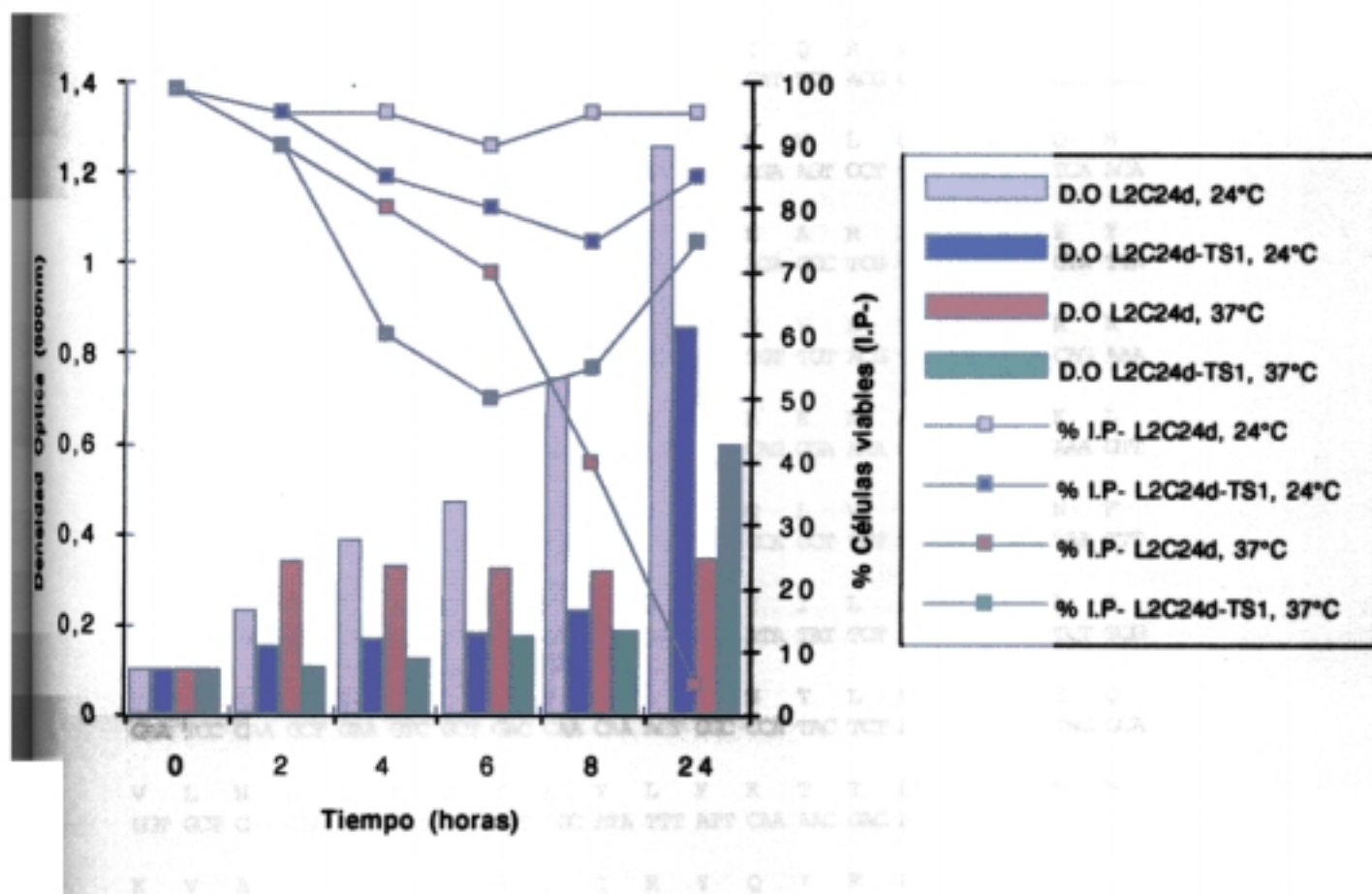


FIGURA 32: CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA CEPA MUTANTE *lyt1* TRANSFORMADA CON *slt1*.

ACT AGT GGA TOC COC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT CGA GGG GGC GGC AAT GTG

M A T L

CTC TAA AGA TCG TTC TGA AAA AAA ATA CTA GGA AGA GAA TCG TAG CAT AAT GGC GAC TTT

F H L I D V H G N E Y Q N V Q D H S L Q
ATT TCA TCT TAT AGA TGT ACA TGG TAA TGA ATA TCA AAA TGT GCA AGA CCA CAG OCT TCA

M A L E E L N Q Q I E V I Q R Q E E Q L
AAT GGC CTT AGA AGA GCT GAA TCA ACA AAT CGA AGT GAT TCA ACG CCA AGA AGA ACA ATT

A L R K K A I E D A R Q E V L Q Q I Q H
GGC TTT GCG AAA GAA GGC AAT TGA GGA TGC AAG GCA AGA AGT GCT CCA GCA AAT TCA ACA

R K F R Q Y L H E R E Q E A R L Q E Y Y
TCG AAA ATT CCG TCA ATA CTT GCA TGA ACG GGA ACA AGA GGC TCG TTT GCA AGA GTA TTA

L E Q L Q E R R A F E N V V R T I I R K
TTT GGA GCA ACT GCA AGA GCG TAG AGC TTT TGA AAA TGT TGT ACG GAC TAT AAT CAG AAA

R F E D E E R E R A H R R E K A A R K L
CCG ATT TGA GGA TGA GGA GCG TGA AAG AGC TCA TCG CAG GGA AAA GGC GGC TCG AAA GTT

L R R I L V S D S P N M Q L V V A N N F
GCT ACG CAG AAT ACT TGT CTC CGA TTC ACC CAA TAT GCA GCT TGT AGT GCC AAA TAA TTT

Q Q M F I H H P V V D Q Y I L L K S L R
CCA GCA AAT GTT TAT TCA TCA TOC AGT CGT AGA ACA ATA TAT TCT CCT GAA GAG TCT TCG

N P K L K S L T N K L A H T L H Q S T Q
GAA TOC CAA GCT GAA GTC CCT GAC CAA CAA ACT GGC CCA TAC TCT ACA TCA GAG TAC GCA

V L N N L N H F A Y L F K T T M H L N N
GGT GCT CAA CAA TCT CAA CCA TTT CGC ATA TTT ATT CAA AAC GAC AAT GCA OCT GAA CAA

K V A Q T L L S L I R Y Q I E A K R L L
CAA AGT GGC CCA GAC GTT GCT GAG CTT AAT ACG CTA CCA AAT AGA AGC AAA ACG TCT TCT

Q A S V S D E E L S R T E L A E L N D Y
CCA ACG TAG TGT TTC TGA TGA GGA GCT TTC TCG CAC CGA GTT GGC CGA ATT GAA CGA TTA

L L A A Q R R S N K R G N A R K H I D L
TTT ATT GGC TGC TCA ACG CCG CTC TAA CAA ACG TGG AAA TGC TAG AAA ACA TAT TGA CTT

T A R E S P S T S F A Q M S K G A L N P
AAC TGC TCG TGA GAG COC ATC CAC ATC TTT CGC ACA CAT GTC GAA AGG TGC TTT GAA TOC

D P E V I E P E D E P T T F R N P L E A
TGA COC AGA AGT CAT TGA ACC TGA AGA CGA ACC TAC TAC GTT TAG AAA COC ACT AGA GGC

L L S T G Q Y S V V S S D E D V E S V R
ATT GTT ATC GAC TGG TCA ATA TTC AGT GGT AAG TAG TGA TGA GGA CGT TGA ATC TGT TCG

D F D D G T L P I H S T Q T V E E P I D
TGA TTT TGA TGA CCG GAC GTT ACC TAT TCA TTC TAC CCA AAC AGT TGA AGA COC CAT AGA

T K A G E K L T D S S K Q P S P P V A E
 CAC GAA GGC GGG AGA GAA ATT AAC TGA CAG CTC AAA ACA AOC TTC AOC TOC TGT TOC TGA

 H F S N E T F S A S P K G V E T D V K S
 ACA TTT CTC TAA TGA GAC CTT TTC GGC CTC TOC TAA AGG OGT TGA AAC TGA TGT AAA GAG

 E G S N N H E Q G S F N E P K S N V D S
 TGA AGG AAG CAA CAA TCA TGA GCA AGG CTC ATT TAA TGA ACC TAA ATC TAA TGT TGA CTC

 N D S A S P K R P S S Q A S L R H N V T
 TAA TGA TTC TGC ATC TOC GAA AAG ACC ATC TTC TCA AGC ATC TTT ACG ACA TAA TGT TAC

 V E E V P D E D A . .
 TGT TGA AGA GGT CCC TGA CGA GGA TGC ATG ATA AAT ATT ATA TTT GTT TAT TAA AAG ATA
 AAA TTT CCT TOC TAA CTA CCA ACA AAT CTA CTT TCA GAC GAA TOC ATT TTT GCA CAT ATC
 TAA TGA CCA ACA TTC ACG TAA TCA CTT ATG ACT GGA TAT ACG ATA ATT TGA ATA AAA AAT
 TTT CAA TGC ATT GAA CAT TTC CTT TGA AGG CAC A

FIGURA 33: SECUENCIA Y MARCO ABIERTO DE LECTURA DE *slt1* de *Schizosaccharomyces pombe*. Código de acceso E.M.B.L.: X86009. En la figura, hemos recuadrado los nexos de unión ("linkers") usados para la construcción de la genoteca.

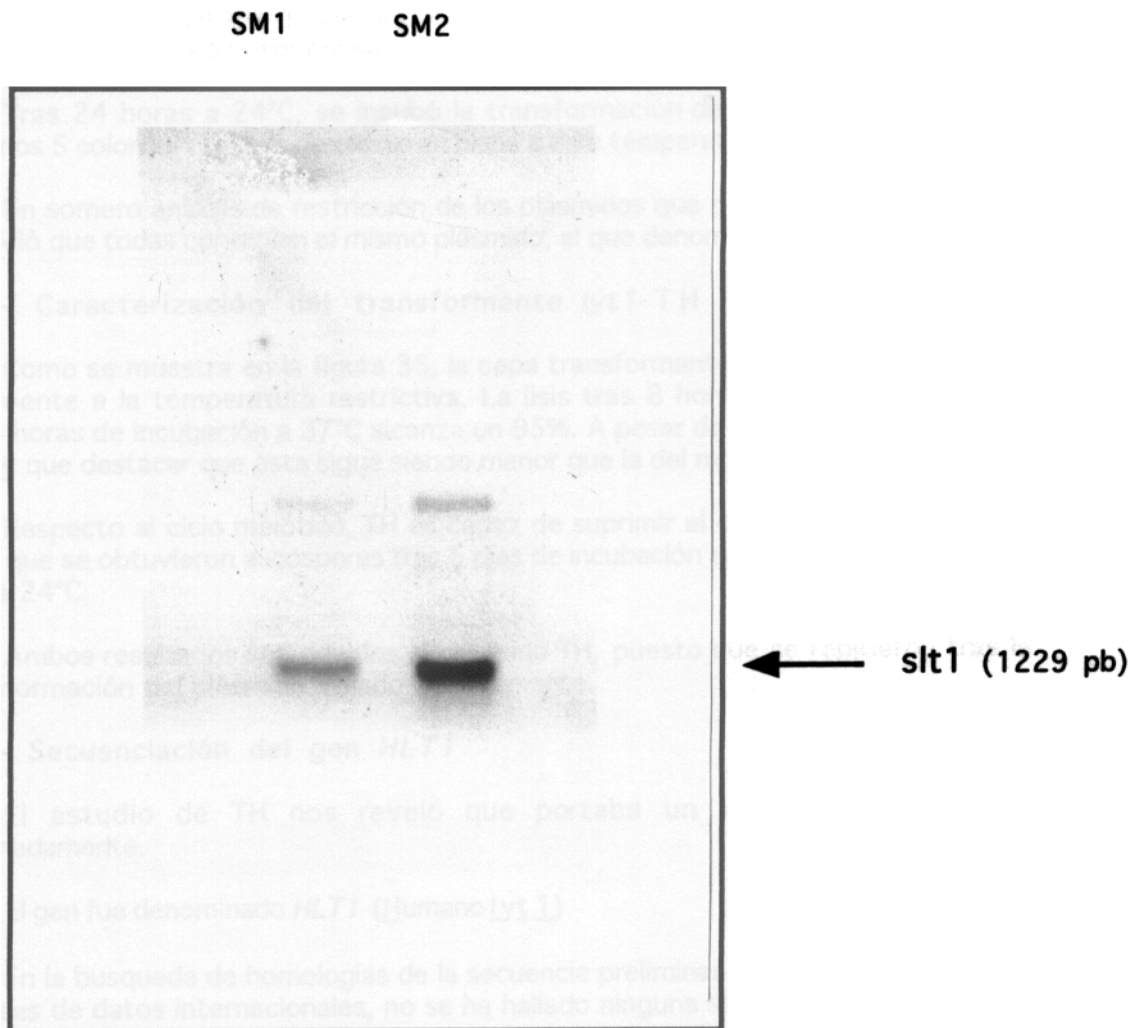


FIGURA 34: HIBRIDACION RNA-DNA. Como matriz, se usó el RNA total de la cepas SM1 y SM2 de *S. pombe*. Como sonda, se usó la totalidad del inserto TS1 (1529 pb) que incluye al gen *slt1* de *S. pombe*.

3.2.- CLONACION DEL GEN *HLT1* (Humano lyt 1) DE *Homo sapiens*

Se transformó la cepa L2C24d (Lyt1), por el método de acetato de litio, con una genoteca de cDNA humana de células HEPG2, ligada al vector episómico pAB23-BXN, bajo la expresión del promotor constitutivo GAP de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tras 24 horas a 24°C, se incubó la transformación directamente a 37°C. Sólo obtuvimos 5 colonias capaces de crecer en placa a esta temperatura.

Un somero análisis de restricción de los plásmidos que portaban dichas colonias nos reveló que todas contenían el mismo plásmido, al que denominamos: "TH".

3.2.1.- Caracterización del transformante *lyt1*-TH

Como se muestra en la figura 35, la cepa transformante TH es capaz de crecer parcialmente a la temperatura restrictiva. La lisis tras 8 horas es de un 60%, pero tras 24 horas de incubación a 37°C alcanza un 95%. A pesar de este alto porcentaje de lisis, hay que destacar que ésta sigue siendo menor que la del mutante original.

Respecto al ciclo meiótico, TH es capaz de suprimir el defecto de esporulación puesto que se obtuvieron ascosporas tras 5 días de incubación en medio de esporulación sólido a 24°C.

Ambos resultados son debidos al plásmido TH, puesto que se repitieron tras la retransformación del plásmido aislado originalmente.

3.1.2.- Secuenciación del gen *HLT1*

El estudio de TH nos reveló que portaba un inserto de 1000 pb aproximadamente.

El gen fue denominado *HLT1* (Humano lyt 1)

En la búsqueda de homologías de la secuencia preliminar de la totalidad de *HLT1* con bases de datos internacionales, no se ha hallado ninguna similitud significativa con cualquier otra secuencia en ellos depositada.

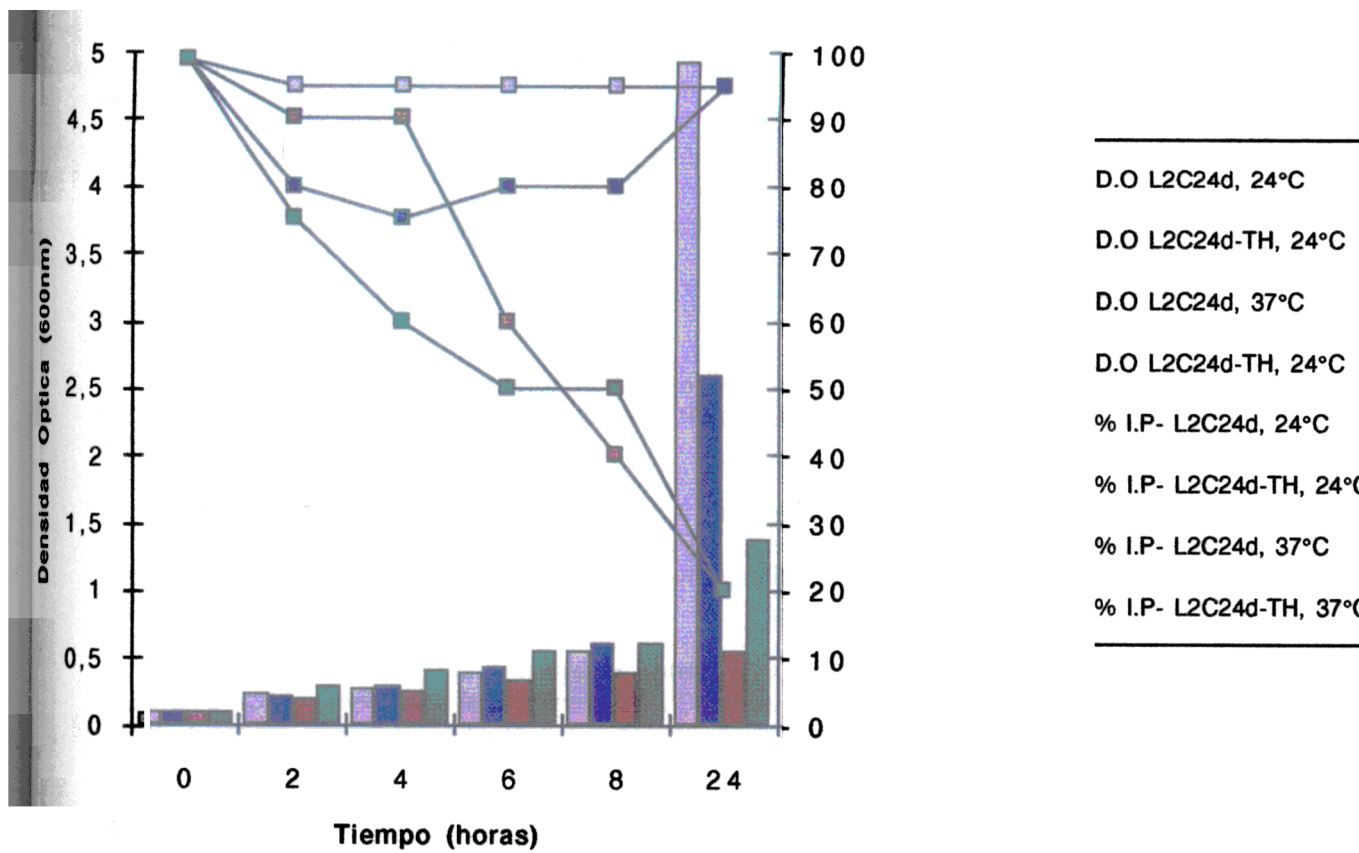


FIGURA 35: ESTUDIO DE CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA CEPA MUTANTE *lyt1* TRANSFORMADA CON *HLT1*

4.- INTERACCION DEL *Lyt1* CON OTROS GENES RELACIONADOS

SPO12 fue clonado en nuestro laboratorio como supresor del defecto fenotípico en el ciclo mitótico que presenta una cepa mutante *lyt1* (Molero *et al.*, 1993). Posteriormente, fue clonado como supresor de *Dbf2p*, una proteína-quinasa implicada en la separación de las cromátidas en la división nuclear mitótica (Parkes *et al.*, 1992).

Para identificar la posible relación de la estirpe mutante *lyt1* con una *dbf2*, así como la posible relación de *SPO12* con *cdc15*, se estudió la epistasia entre estos genes a un nivel fenotípico.

4.1.- RELACION CON *Dbf2p*.

Para estudiar la relación *Lyt1/Dbf2* se siguieron dos aproximaciones:

4.1.1.- Estudio fenotípico del diploide MY40 (*lyt1/dbf2* heterozigótico).

Fenotípicamente, la mutación *dbf2-1* es similar a la *lyt1* pues también produce la detención del crecimiento, a temperatura restrictiva, con un fenotipo de células en dobles (Parkes *et al.*, 1992).

Así pues, se contruyó el diploide heterozigótico MY40 (*MATa/MAT α* , *dbf2/DBF2*, *LYT1/lyt1*, *ura3 Δ 52/ura3 Δ 52*, *trp1-2/TRP1-2*, *ADE1/ade1*) por micromanipulación y se estudió tanto el fenotipo mitótico a 37°C como su capacidad para esporular.

El diploide resultó ser totalmente normal en ambos aspectos fenotípicos, lo que nos indicó que la semejanza fenotípica *Lyt1* y *Dbf2* se debe a una coincidencia en la fase del ciclo celular donde ambos paran a la temperatura restrictiva.

4.1.2.- Estudio fenotípico de la estirpe mutante *dbf2-1* transformada con los genes relacionados descritos en este trabajo.

Se decidió buscar supresores del fenotipo conferido por una mutación en el gen *DBF2*, entre los genes que habían sido clonados como supresores de la mutación *lyt1*.

Para ello se transformó una cepa haploide *dbf2-1*, por acetato de litio, con los siguientes plásmidos:

- | | |
|--|--|
| * T2 (Centromérico, <i>CDC15</i> , <i>NPK1</i>) | * T7 (Centromérico, <i>CDC15</i> , <i>NPK1</i>) |
| * TS1 (Episómico, <i>slt1</i>) | * TH (Episómico, <i>HLT1</i>) |
| * cSPO12 (Centromérico, <i>SPO12</i>) | * mSPO12 (Episómico, <i>SPO12</i>) |
| * pBS9 (Centromérico, <i>CDC15</i>) | |

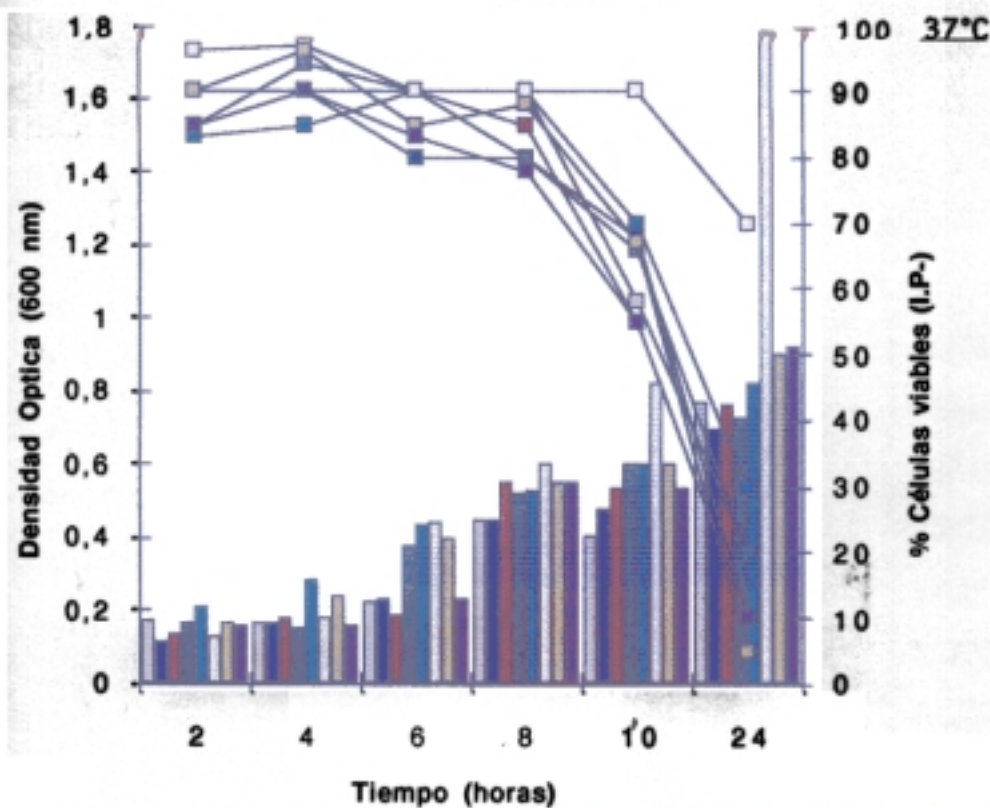
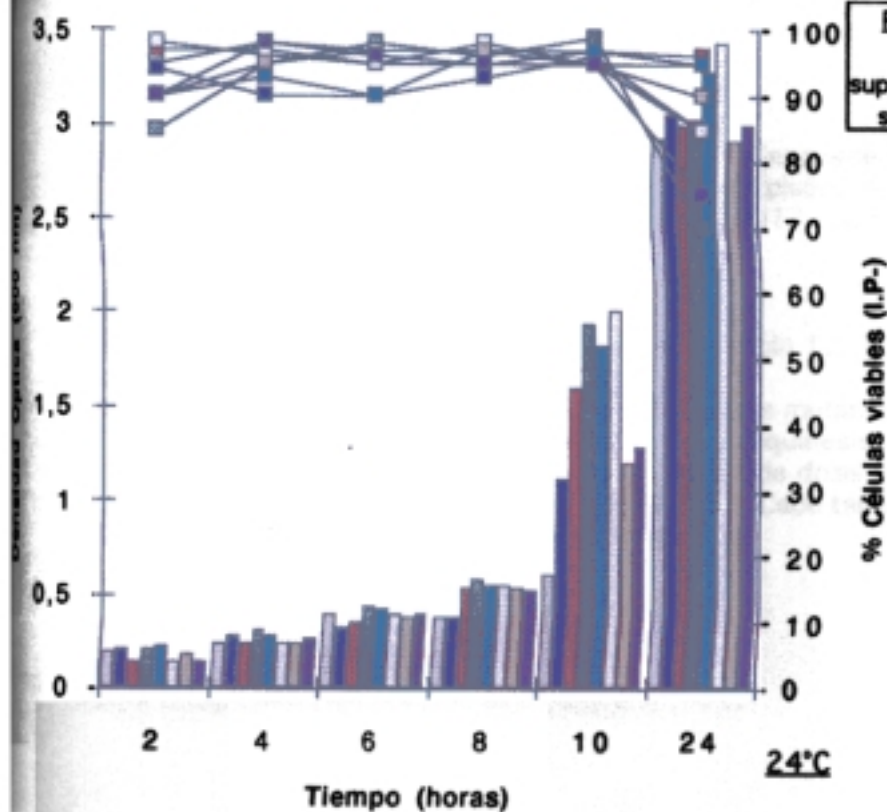
Tal como se muestra en la figura 36, sólo *SPO12* expresado en un vector multicopia es capaz de suprimir totalmente el fenotipo *Dbf2* aunque es importante resaltar la complementación parcial del fenotipo por parte de los genes *slt1* y *HLT1*.

4.2.- RELACION *Cdc15/Spo12*.

Como se había demostrado previamente que *SPO12* era capaz de complementar el defecto mitótico *Lyt1*, nos interesó saber si también era capaz de suprimir en otro fondo genético una única mutación *cdc15*.

Para ello se transformó una cepa haploide *cdc15-1*, por acetato de litio, con los siguientes plásmidos:

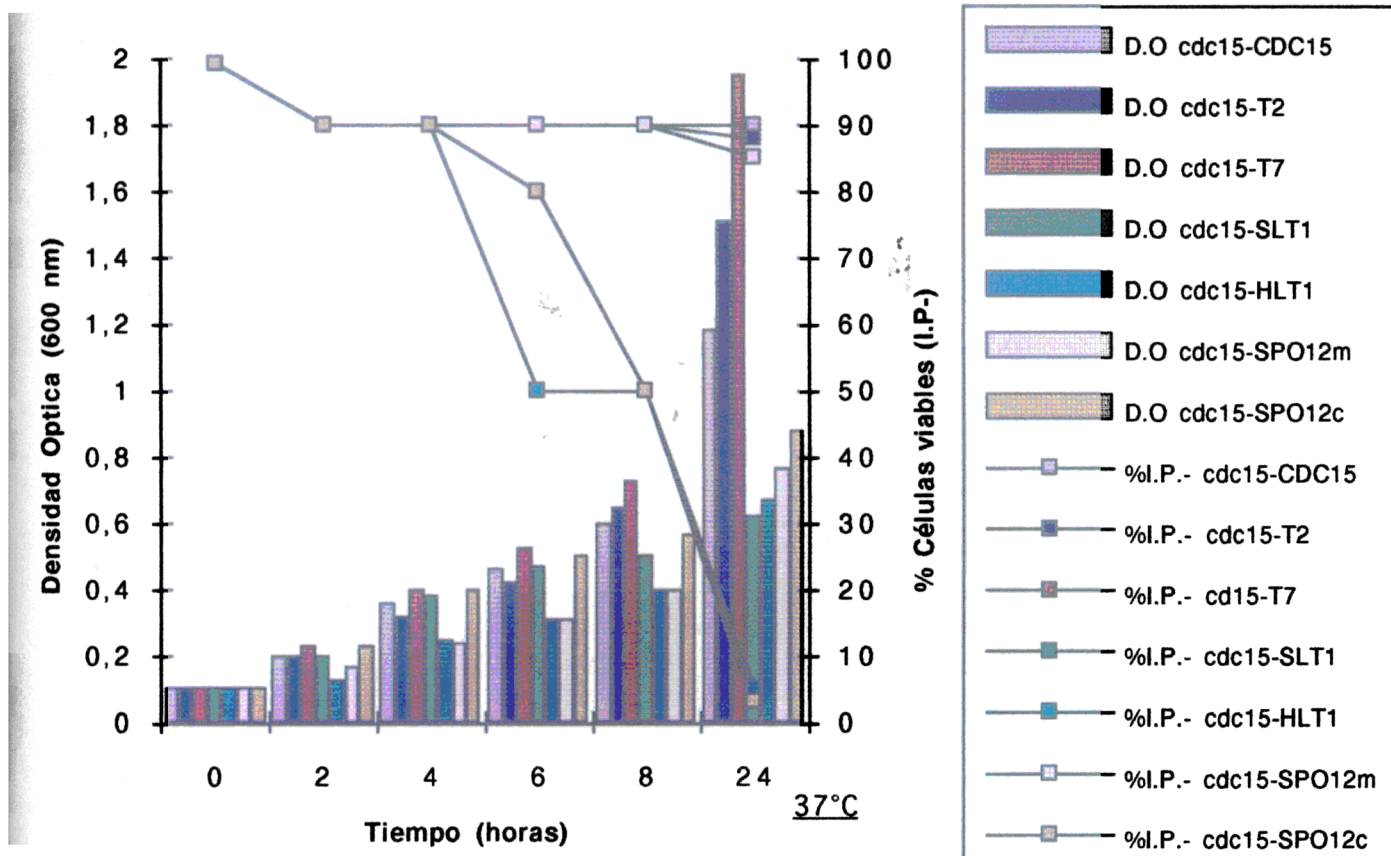
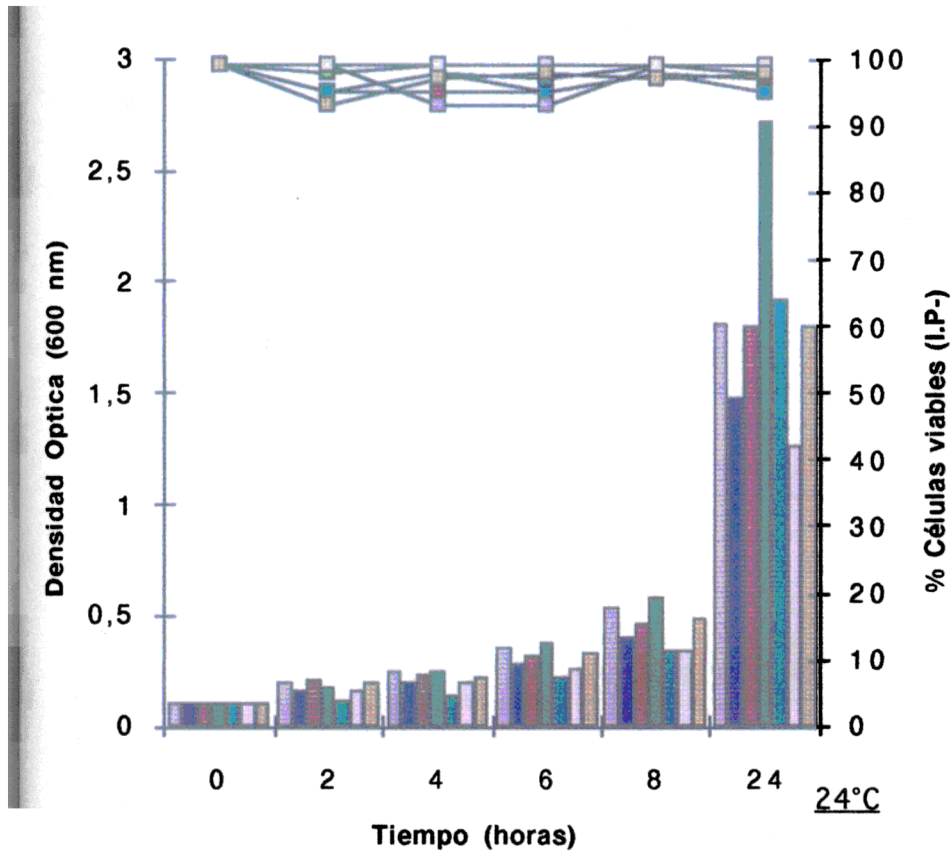
FIGURA 36: RELACION dbf2/SUPRESORES DEL *Lyt1*. Sólo mSPO12 es capaz de suprimir totalmente el fenotipo termosensible, si bien *slt1* y *HLT1* lo hacen parcialmente.



- | | |
|--|--|
| * T2 (Centromérico, <i>CDC15</i> , <i>NPK1</i>) | * T7 (Centromérico, <i>CDC15</i> , <i>NPK1</i>) |
| * TS1 (Episómico, <i>slt1</i>) | * TH (Episómico, <i>HLT1</i>) |
| * cSPO12 (Centromérico, <i>SPO12</i>) | * mSPO12 (Episómico, <i>SPO12</i>) |
| * pBS9 (Centromérico, <i>CDC15</i>) | |

Como se puede observar en la figura 37, sólo T2, T7 y pBS9 son capaces de suprimir totalmente el fenotipo Cdc15. mSPO12 complementa la parada en fase G2 que este mutante presenta a 37°C, aunque las células presentan un grave defecto en citoquinesis que les conducirá a un crecimiento en cadenas (este hecho es un efecto de dosis puesto que no se observa complementación alguna del fenotipo en cSPO12). Cabe también resaltar que ni TS1 ni TH son capaces de complementar el fenotipo Cdc15.

FIGURA 37: RELACION ENTRE Cdc15 Y Spo12.
mSPO12 suprime el fenotipo Cdc15.



DISCUSION

1.- ANALISIS DE LAS CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LA ESTIRPE *lyt 1*, UN MUTANTE *cdc* DE *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.- LA CEPA *lyt 1* ES UN MUTANTE *cdc*

Todos los estudios realizados hasta el inicio de este trabajo habían descrito al mutante *lyt 1* como termosensible, autolítico y con un defecto en el ciclo meiótico independiente de la temperatura (Molero *et al.*, 1993).

El hecho de que a 37°C se produjera una parada en el crecimiento siempre en el mismo punto del ciclo celular, apuntaba hacia que pudieramos estar trabajando con un mutante *cdc* de *Saccharomyces cerevisiae*. Para intentar confirmar esta evidencia se siguieron diferentes aproximaciones: una química, otra citométrica y una última morfológica.

La ausencia de lisis a 37°C en un cultivo tratado tanto con hidroximetilurea como con benomil (figuras 10 y 11), sitúa el defecto de la estirpe mutante *lyt 1* al final del ciclo, en un pequeño tramo próximo a la citoquinesis. La proteína codificada por el gen mutado debería ser necesaria tras la síntesis de los ácidos nucleicos y el ensamblaje de los microtúbulos, lo cual era acorde con el hecho que, en este mutante, la parada del ciclo se produjera con un tamaño de yema grande. Si dicha proteína hubiera sido necesaria antes de la fase S, la lisis hubiera tenido lugar incluso en presencia de ambos inhibidores químicos.

Para intentar delimitar aún más la fase del ciclo donde detenía su crecimiento la cepa mutante *lyt 1* a temperatura no permisiva, se hizo una tinción de núcleos para comprobar en qué estado de división se hallaba la célula en el momento de la parada. El núcleo de *Saccharomyces cerevisiae* se divide en el eje de unión célula madre/célula hija, para desplazarse hacia los extremos de ambas células conforme se acerca la mitosis. En la citoquinesis, ambos núcleos se hallan totalmente separados en los extremos opuestos de las dos células.

Se pudo comprobar, tal y como se ha mostrado en figura 12, que el crecimiento mitótico de la cepa mutante *lyt 1* se detiene, a 37°C, en una fase próxima a la citoquinesis, puesto que los núcleos se encuentran totalmente separados y situados en las zonas apicales de la célula madre y de la célula hija.

Los mutantes *cdc*, por definición, son aquellos que detienen su crecimiento en un punto determinado del ciclo mitótico durante la primera división tras el cambio a condiciones restrictivas.

Para poder afirmar que la cepa *lyt 1* es un mutante *cdc*, no sólo se tenía que estudiar el punto exacto de parada, sino también si ésta se producía en el primer ciclo que tenía lugar a 37°C. La técnica recomendada para este estudio es el análisis de la división del DNA por citometría de flujo, usando como fluorocromo el yoduro de propidio. De esta manera se puede hacer un estudio estadístico y cuantitativo, en una población significativa de células, de la fase de división del DNA.

En efecto, este estudio confirmó los datos cualitativos anteriores, mostrando que el ciclo se paraba en el primer período G2/M, tras pasar a condiciones no permisivas (Figura 13). Este hecho identificaba de manera concluyente a la estirpe *lyt 1* como un mutante *cdc* del final del ciclo mitótico.

1.2.- LA INTEGRIDAD CELULAR DEPENDE DE UNA SÍNTESIS ACTIVA DE PROTEÍNAS

Saccharomyces cerevisiae tiene la capacidad de metabolizar el carbono del medio por dos vías: una fermentativa y otra oxidativa, esta última de mayor rendimiento energético que la primera (Lagunas *et al.*, 1983). Existen mutantes de ciclo celular (p.e: *clb5*, *clb6*), por razones aún no determinadas, cuyo defecto les impide crecer en fuentes de carbono distintas de glucosa o galactosa (F. Cross, comunicación personal).

Se decidió, por esta razón, estudiar el fenotipo de nuestro mutante en dos fuentes de carbono fermentables (glucosa y galactosa) y en una oxidativa (glicerol).

Como se muestra en la figura 14, el crecimiento tanto en galactosa como en glicerol de la estirpe mutante *lyt1* está ralentizado, o se podría decir que inhibido, puesto que el tiempo de generación es mayor de 20 horas, de manera independiente a la temperatura en que se efectúe el crecimiento.

Cabe destacar que a 37°C también se halla disminuida la lisis, en comparación con la viabilidad, en igualdad de condiciones, en glucosa. En el caso de crecimiento en glicerol llega a ser sólo de un 30%, y en el caso de crecimiento en galactosa de un 50%, tras 20 horas de crecimiento en condiciones restrictivas.

Esta falta de crecimiento podría deberse a un defecto mitocondrial que impidiera el metabolismo oxidativo de la levadura.

Sin embargo, como se observa en la figura 15, la eritromicina (inhibidor mitocondrial) no suprime el defecto autofítico termosensible *lyt1*, ni en glucosa ni en galactosa.

Este dato indica que posiblemente la función mitocondrial esté intacta en ambas temperaturas, puesto que no se observa ninguna diferencia en el comportamiento del mutante con o sin eritromicina, y parece indicar que el fenotipo *Lyt1* es independiente de la actividad mitocondrial.

Para confirmar, finalmente, que la ruta de la fosforilación oxidativa era funcional, se hizo un sencillo ensayo con 2',3',5'-trifenil-tetrazolio, que en el caso de ser oxidado en la ruta mitocondrial da una coloración roja a las células. Este ensayo resultó negativo lo que nos hizo descartar definitivamente una implicación mitocondrial en el defecto mitótico del mutante *lyt1*.

¿Podría deberse la menor lisis que se observó en fuentes de carbono como galactosa o glicerol simplemente a la disminución del crecimiento?

Para comprobar este hecho, se hizo una incubación en un medio con glucosa suplementado con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), con la hipótesis en mente que en el caso de que la lisis fuera dependiente del crecimiento, este inhibidor la suprimiría.

El tratamiento con cicloheximida, tal como se muestra en la figura 16, confirmó nuestras hipótesis, puesto que la lisis, en condiciones no permisivas, no tuvo lugar cuando se inhibió la síntesis de proteínas.

Este dato sugiere que, para que la rápida pérdida de viabilidad que se observa tras la parada del ciclo mitótico a 37°C tenga lugar, es necesaria una síntesis activa de proteínas, que no se ve inhibida por la detención de la división celular.

1.3.- EL CICLO MEIOTICO SE DETIENE TRAS LA MEIOSIS I.

Se decidió poner a punto, siguiendo las pautas habituales para el ciclo mitótico, el estudio por citometría de flujo del ciclo meiótico de *Saccharomyces cerevisiae*, en concreto de la cepa diploide homocigótica *lyt 1/lyt 1*. El objetivo de este estudio fue caracterizar con precisión el defecto que, en esporulación, presentaba esta cepa para poder determinar cual era el punto de la división meiótica que se encontraba afectado.

Usamos como control en este estudio una cepa diploide homocigótica $\Delta spo12$ (Malavasic y Elder, 1992), cuyo defecto tiene como consecuencia la formación de esporas apomíticas ($2n$) y que cuyo ciclo meiótico se detiene en un punto similar al que se sospechaba para el mutante *lyt 1*.

El inicio del ciclo fue normal, comparado con la cepa control: la replicación del DNA tuvo lugar observándose un estadio tetrahaploide, similar tanto en el mutante *lyt 1* como en el $\Delta spo12$.

Posteriormente, se observó el inicio de la primera división meiótica, donde la célula tendría que pasar de un estado $4n$ a formar dos núcleos $2n$ (como es el caso de $\Delta spo12$) (Figura 18). La cepa diploide homocigótica *lyt 1/lyt 1* empieza la división recombinacional, pero no la llega a completar. En lugar de formarse dos núcleos diploides, se forma un estadio aberrante $2n-4n$. A partir de ese momento, la lisis se incrementa hasta llegar a más de un 50%, lo que probablemente se deba a la división cromosómica incompleta que se observa por citometría.

La meiosis I es la fase del ciclo meiótico donde se produce el entrecruzamiento cromosómico y la recombinación génica. Posteriormente, las cromátidas hermanas se han de separar para proseguir con la meiosis reduccional. Este paso es "similar" a la separación de las cromátidas hermanas que se produce en el ciclo mitótico, en la anafase, paso defectivo también en *cdc15* (Johnston et al., 1990; Schweitzer y Philippsen, 1991; Toyn et al., 1993, 1994). Se podría hipotetizar que en ambos ciclos el proceso de separación de las cromátidas tiene lugar por un mecanismo semejante. Además, en nuestro caso, quizás por la conjunción de las dos mutaciones que presenta la estirpe mutante *lyt 1*, se vean afectados los dos ciclos.

1.4.- EXISTE UN DEFECTO, A 37°C, EN LA ELECCION DEL PATRON DE GEMACION EN CELULAS HAPLOIDES

El patrón de gemación de *S. cerevisiae* está determinado genéticamente y difiere entre las células haploides (gemación exclusivamente axial) y las diploides (gemación predominantemente bipolar).

Se ha observado que en las cepas haploides *lyt 1*, a 37°C, las yemas inician una gemación apical (en vez de axial) que es abortada por la parada del ciclo mitótico en la citoquinesis de la primera división. Sin embargo, la gemación en cepas diploides homocigóticas se inicia, a 37°C, de manera totalmente normal.

Este defecto en la elección del patrón de gemación es suprimido por los genes que restituyen el fenotipo silvestre en el ciclo mitótico del mutante *lyt 1* a la temperatura restrictiva (p. e: *CDC15*, *SPO12*). Con estos datos, este defecto se podría atribuir a la parada del ciclo en mitosis, más que una consecuencia primaria de la mutación *cdc15*.

La falta de citoquinesis, y con ello la falta de reorganización intracelular, podría obligar a las células a crecer según el patrón de polaridad establecido para la gemación anterior (Chant *et al.*, 1994). Al suprimir el fenotipo *Cdc* y permitir un crecimiento normal a 37°C, bien por expresión en vectores multicopia de genes supresores (*SPO12*) o bien por expresión del estructural (*CDC15*), también se permitiría la reorientación de las señales intracelulares que causarían una gemación acorde con el patrón habitual descrito para células haploides silvestres.

2.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS GENES RESPONSABLES DEL FENOTIPO *Lyt1*.

Se transformó, en la cepa L2C24d, una genoteca genómica centromérica comercial de *S. cerevisiae*, con el objeto de aislar los genes reponsables del fenotipo *Lyt1*, tanto del defecto mitótico como del meiótico.

Se obtuvieron catorce transformantes en los que se había complementado el fenotipo *Lyt1*, de entre los cuales se escogieron dos (T2 y T7) para su estudio más detallado por ser los que suprimían totalmente tanto el fenotipo lítico *Cdc* (Figura 20) como la incapacidad de esporulación de la estirpe mutante *lyt1*.

Debido al gran tamaño inicial de los insertos de los plásmidos que portaban estos transformantes, se procedió a realizar las subclonaciones pertinentes (Figura 21 y Figura 22) para hallar el mínimo fragmento capaz de suprimir la mutación *lyt1*.

Así se obtuvo el fragmento menor: T7N1, de un tamaño de 9Kb aproximadamente, capaz de complementar la mutación.

Cuando a este fragmento se le delecionaba el fragmento interno de 700pb *XbaI*-*XbaI*, se perdía la capacidad de suprimir el defecto en el ciclo meiótico, si bien mantenía la capacidad de suprimir el defecto en el ciclo mitótico.

De manera similar, el inserto T2 perdía la capacidad de complementar el defecto de esporulación cuando se le eliminaba un fragmento interno *XbaI*-*XbaI* de tamaño similar al de T7.

En este punto, se secuenciaron ambos fragmentos *XbaI*-*XbaI*. La secuencia reveló que ambos eran idénticos y que se trataban del extremo 3' del gen *NPK1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Este dato, junto con un análisis de restricción (Figura 21 y 22), nos indicó que el inserto que portaba T2 estaba incluido en el inserto que portaba T7.

Posteriormente, se secuenció el fragmento interno de T7N1 *XhoI*-*XhoI*, esencial para la complementación del defecto α de la cepa mutante *lyt1*.

La secuencia de este último fragmento nos reveló que habíamos aislado dos genes contiguos físicamente, ambos aparentemente responsables del fenotipo *Lyt1*: *CDC15* y *NPK1*.

Cdc15p es una proteína-quinasa implicada en la mitosis y citoquinesis celular. Es esencial para la consecución del ciclo celular y su defecto supone la parada de la división en anafase, con un tamaño de yema grande. Hasta ahora, no se le ha descrito ningún papel en el ciclo meiótico. Sus sustratos o efectores son desconocidos (Schweitzer y Philippsen, 1991), aunque posiblemente su función esté relacionada con la degradación de *Clb2p* (Amon *et al.*, 1993).

En nuestro caso, el gen responsable del defecto autolítico termosensible en el ciclo mitótico del *lyt1* es el *CDC15*, si bien el fenotipo *Lyt1* difiere del fenotipo *Cdc15* descrito anteriormente (Wheals, 1983; Schweitzer y Philippsen, 1992), puesto que nunca antes se había descrito un proceso de lisis asociado a este mutante.

Así pues, en este trabajo, se describe por primera vez un mutante *cdc15* lítico (sólo un 20% de células viables tras ocho horas de incubación a la temperatura restrictiva). Se podría relacionar de manera lateral, a este gen de función no definida, y más en concreto, la mutación que porta el alelo responsable del fenotipo *Lyt1*, con algún proceso de mantenimiento de la integridad de la pared tras la parada del ciclo celular en condiciones restrictivas.

Varios datos confirman la identidad de *CDC15* como responsable del fenotipo autolítico *Cdc* que presenta la cepa mutante *lyt1*:

1.- El pertenecer al mismo grupo de complementación que RH210-3c (*MATa*, *cdc15*, *ade2-1*, *his4*, *trp1*, *ura3*, *leu2*, *bar1*) (Schweitzer y Philippsen, 1991). El diploide heterocigótico *cdc15/lyt1*, aunque presenta una esporulación silvestre, presenta un fenotipo *Cdc* autolítico y termosensible (Figura 25), similar al que presenta el diploide homocigótico *lyt1/lyt1*, o al fenotipo *Cdc* descrito para el diploide homocigótico *cdc15/cdc15* (Schweitzer y Philippsen, 1991; J. Jiménez, comunicación personal). Este dato nos indica determinadamente que las mutaciones que presentan ambas cepas se encuentran en el mismo gen, puesto que en ni *cdc15* ni *lyt1* son mutaciones dominantes (Schweitzer y Philippsen, 1991; G. Molero, 1992).

2.- La supresión del fenotipo *Cdc* autolítico termosensible tanto por la expresión de *CDC15* en un vector de bajo número de copias (Figura 25), como por la expresión endógena de una copia silvestre de dicho gen integrada en el genoma en una cepa haploide *lyt1* (Figura 29).

Sin embargo, un defecto en *CDC15* no es responsable del defecto *Lyt1* en el ciclo meiótico, puesto que una expresión del gen silvestre no es capaz de restituir la esporulación de un diploide homocigótico *lyt1/lyt1*.

3.- El rescate alélico de la copia mutada del gen *CDC15* de la estirpe mutante *lyt1* y la construcción de quimeras entre el gen silvestre y la copia mutada (Figura 28), nos mostró que la mutación se encuentra en el marco abierto de lectura y no en el promotor (Figura 28). La quimera construida con el promotor del gen silvestre y el marco abierto de lectura de *cdc15* (*lyt1*) era incapaz de suprimir el defecto en el ciclo mitótico *Lyt1*. Como cabe esperar, la quimera construida con el promotor del alelo mutado rescatado y el marco abierto de lectura silvestre sí fue capaz de complementar la mutación de manera similar al gen totalmente silvestre (Figura 29).

4.- La transcripción de *CDC15* está disminuida en la estirpe mutante *lyt1* (en comparación con una cepa silvestre) (Figura 24).

El hecho que el promotor del *CDC15* del mutante *lyt 1* sea funcional, junto con el hecho que la transcripción se encuentre disminuída, indica la posible existencia de un ciclo de retroalimentación positiva en la regulación de la transcripción de *CDC15*, mediado bien por sí mismo o por los sustratos que fosforila, que en el caso del *lyt 1* se encontraría inactivado.

El hecho que *CDC15* no sea capaz de complementar el defecto de esporulación, implica que el fenotipo *Lyt1* no es debido sólo a una mutación. Sorprendentemente, estas mutaciones parecen segregar juntas, puesto que en trabajos anteriores (Cabib y Durán, 1975; Santamaría, 1985; Molero, 1992) en los que se había procedido a la "limpieza del fondo genético" de este mutante y a su estudio preliminar, nunca se observó la segregación separada de los caracteres de deficiencia en esporulación de la parada del ciclo celular a 37°C. En un principio, se pensó que se trataba de una única mutación pleiotrópica.

Npk1p es una proteína-quinasa homóloga al gen *nimA* de *Aspergillus nidulans* (Schweitzer y Philippsen, 1992). Este gen ha sido aislado, además, en otras dos ocasiones (*FUN52* (Barton *et al.*, 1992), *KIN3* (Jones *et al.*, 1990)) sin que en ninguna se describiera su implicación ni en el ciclo mitótico ni en el meiótico. Su disrupción no supone ningún defecto en el ciclo mitótico, ni en crecimiento en distintas fuentes de carbono, ni en esporulación (Schweitzer y Philippsen, 1992).

En este trabajo, se ha demostrado que en un fondo genético *cdc15*, un defecto en Npk1p es responsable de la parada del ciclo meiótico tras la meiosis I, impidiendo una esporulación normal.

Tres datos fundamentan principalmente esta aseveración:

1.- El hecho que dicho gen sea capaz de complementar sólo el defecto de esporulación de la cepa diploide homocigótica *lyt 1* cuando se halla integrada una copia silvestre en su locus genómico.

Además, colateralmente al experimento anterior, se transformó *NPK1* (fragmento *Bam*HI-*Bam*HI del inserto T7NI) en un vector de bajo número de copias observándose que sólo es capaz de complementar el defecto de esporulación *lyt 1*, sin ser capaz de suprimir el defecto autolítico *cdc*.

2.- En la estirpe mutante *lyt1*, *NPK1* está mutado. Así se demuestra en el rescate alélico de dicho gen (Figura 30).

La construcción de la quimera formada por el extremo 5' (1-958 pb) del alelo rescatado de la cepa mutante y por el 3' silvestre (958-1054 pb), mostró que la mutación se halla en las primeras 958 bases del marco abierto de lectura (en las que incluyen ocho dominios conservados de los once descritos para las proteína-quinasa), puesto que esta construcción fue incapaz de suprimir el defecto de esporulación de la diploide homocigótica *lyt 1/lyt 1*.

Como cabía esperar, la quimera construída a partir del extremo 5' del gen silvestre (1-958 pb) y del 3' del alelo rescatado (958-1054 pb), expresada en un vector centromérico, complementó el defecto en esporulación del mutante *lyt 1*, de manera similar al gen *NPK1* silvestre.

3.- Se detecta una expresión menor de *NPK1* en una cepa *lyt1*, respecto a una cepa silvestre, lo que indica que la transcripción está disminuida en el ciclo mitótico de la cepa mutante (Figura 24).

Los hechos anteriormente expuestos confirman que *Lyt1* es un fenotipo causado por la mutación de dos genes: *CDC15* y *NPK1*.

Es la primera vez que se describe un fenotipo para *NPK1* que, a pesar de no ser un gen específico de esporulación, puesto que se transcribe en células en ciclo mitótico (como se muestra en el "Northern"), es esencial en esporulación cuando *CDC15* es defectivo. Cabe resaltar que sólo la conjunción de ambas mutaciones inhibe el proceso de esporulación, puesto que ninguna de ellas por separado muestra un fenotipo en ciclo meiótico.

Se podría hipotetizar, aunque no tenemos evidencias para ello, que ambas quinasas actúen complementariamente sobre un mismo sustrato cuya fosforilación sea esencial para la consecución del ciclo meiótico. De esta manera, se podría justificar que ni la cepa mutante *cdc15* ni la *npk1* muestren un ciclo meiótico aberrante y que sólo cuando ambas quinasas son defectivas, como es nuestro caso, no se concluya la esporulación.

2.1.- ESTUDIO DEL *Lyt1* EN RELACION CON OTROS GENES Y MUTACIONES

SPO12 fue aislado como gen específico para la esporulación cuyo defecto tiene como consecuencia la formación de esporas apomíticas (Malavasic y Elder, 1992). Posteriormente, fue aislado como supresor del defecto mitótico de la cepa mutante *lyt1* (Molero et al., 1993) y de *dbf2-1* (Johnston et al., 1990; Parkes et al., 1992).

Dbf2p es una proteína-quinasa que forma un complejo junto con Dbf20p y Spo12p con una función esencial en la separación de las cromátidas hermanas en la citocinesis celular. Tiene una transcripción periódica con un máximo en la fase M; sin embargo, la actividad quinasa medida para esta proteína es posterior a este máximo, no tiene lugar hasta la anafase y está regulada post-traduccionalmente (Johnston et al., 1990; Toyn et al., 1994).

Al mismo tiempo se describió una interacción entre Dbf2p y Cdc15p, al ser esta última supresora en sobreexpresión del defecto de la primera (Toyn et al., 1994).

Debido a estas interacciones se decidió estudiar la relación entre estos genes y *Lyt1* y, si había algún tipo de relación con *slt1* de *S. pombe* y *HLT1* humano, que se comentarán posteriormente.

Para ello, se transformó una cepa *dbf2-1* con *CDC15*, T7, *SPO12*, *slt1* y *HLT1*, y se estudió su fenotipo a 37°C durante 24 horas. Como se esperaba, la sobreexpresión de *SPO12* suprimía el fenotipo Dbf2. Sin embargo, la expresión en un vector de bajo número de copias de *CDC15*, *CDC15* + *NPK1* o *SPO12* no restituyó un fenotipo silvestre. Paradójicamente, los genes heterólogos *slt1* y *HLT1*, que habían sido aislados por su capacidad de complementar el defecto de esporulación de una cepa mutante homocigótica *lyt1/lyt1* eran capaces de suprimir parcialmente el fenotipo mitótico termosensible Dbf2.

Este hecho confirma que el defecto *lyt1* de esporulación es similar al defecto *dbf2* en división mitótica, y que se debe posiblemente a un defecto en la separación de cromátidas tras la recombinación génica. Además, otorga un posible mecanismo de acción a los genes heterólogos aislados, hasta ahora de función desconocida debido a la falta de homologías con las proteínas depositadas en las bases de datos internacionales.

Una segunda aproximación, complementaria a la anterior, para el estudio de estas espistásias fue la transformación la cepa RH210-3c (MATa, *cdc15*, *ade2-1*, *his4*, *trp1*, *ura3*, *leu2*, *bar1*) (Schweitzer y Philippsen, 1992) con los genes anteriormente utilizados para el estudio de *dbf2*.

El estudio del fenotipo termosensible Cdc15 de los transformantes nos reveló que sólo la expresión de *SPO12* en vectores multicopia era capaz de suprimirlo (además, por supuesto de *CDC15* y *CDC15+ NPK1*).

Sin embargo, se observa una diferencia entre las mutaciones *cdc15* y *lyt1*. *SPO12*, sólo cuando es expresado en un vector multicopia, es capaz de suprimir totalmente el defecto mitótico de la estirpe mutante *lyt1*. En el caso de la cepa *cdc15*, a pesar de que existe crecimiento a 37°C sin observarse lisis, las células presentan un grave defecto en citoquinesis formándose largas cadenas de células que no llegan a separarse. Esta diferencia puede deberse a que el fondo genético distinto que poseen ambas cepas, influya, de alguna manera que desconocemos, en acentuar el fenotipo en el caso de la cepa RH210-3c (*cdc15*) pero no en el caso de la cepa L2C24d (*lyt1*).

Toda esta serie de interacciones nos lleva a proponer una hipótesis de acción de Cdc15p tanto en la división mitótica como en la meiótica.

En el ciclo mitótico, parece lógico que Cdc15p actúe de manera que transmita la señal de "citoquinesis", quizás proveniente de Clb2p, a Dbf2p/Dbf20p que coordinan la separación de las cromátidas hermanas en mitosis.

En el ciclo meiótico, Cdc15p y Npk1p podrían actuar de manera complementaria, transmitiendo una señal para la separación de cromátidas tras la meiosis I, de manera similar a cómo lo hace *CDC15* en mitosis.

Esto explicaría que la disfunción conjunta de *CDC15* y *NPK1* hiciera inviable la esporulación, como ocurre en nuestro caso, hecho no descrito hasta ahora.

3.- ESTUDIO DE DOS GENES HETEROLOGOS CAPACES DE COMPLEMENTAR EL DEFECTO DE ESPORULACION *Lyt1*.

3.1.- *slt1* DE *Schizosaccharomyces pombe*.

slt1 es un gen aislado a partir de una genoteca de cDNA de *Schizosaccharomyces pombe* que fue transformada en la cepa L2C24d con objeto de buscar genes heterólogos capaces de complementar el fenotipo *Lyt1*.

En el estudio fenotípico de la cepa transformante portadora del gen *slt1*, en un vector de sobreexpresión bajo el promotor ADH de *Saccharomyces cerevisiae*, se observó que era capaz de complementar el defecto en el ciclo meiótico *Lyt1*. Sin embargo, no era capaz de suprimir el defecto en el ciclo mitótico, puesto que la cepa transformante seguía presentando un fenotipo Cdc a temperatura restrictiva, si bien éste no era tan acusado como en la cepa parental (Figura 32), puesto que la lisis decrecía en un 50% tras 8 horas de incubación a la temperatura restrictiva.

La secuencia del inserto aislado reveló la existencia de un marco abierto de lectura de 433 aminoácidos. El análisis teórico de Slt1p nos muestra una proteína de 49.546 Kd de peso molecular, altamente hidrofílica y pronostica una estructura secundaria mayoritariamente en hélice alfa.

El hecho de que *slt1*, que se expresa habitualmente en el ciclo mitótico de *Schizosaccharomyces pombe*, como se pudo comprobar por "Northern", esté complementando un defecto de esporulación en *Saccharomyces cerevisiae*, podría indicar que existe una función paralela tanto en el ciclo mitótico como meiótico, probablemente relacionada con las fases finales de la división del DNA.

En nuestro caso al ser defectiva la esporulación por la mutación de *NPK1* en un fondo genético *cdc15*, *slt1* podría estar sustituyendo funcionalmente a *NPK1* o a algún sustrato por ella fosforilado; a pesar de no ser similares en cuanto a su secuencia nucleotídica ni tener en común motivos peptídicos, ni siquiera los motivos conservados de las proteínas-quinasas que aparecen en *NPK1*. Además, la diferencia en el porcentaje del número de viables, en condiciones restrictivas, que se observa en la cepa transformada con *slt1* en comparación con el mutante original, pudiera deberse, aunque no tenemos evidencias para ello, a que *slt1* podría estar sustituyendo funcionalmente de manera parcial a algún componente en la ruta que inicia *CDC15*, lo que parcialmente sustituiría su defecto.

Existe un proyecto para el estudio funcional de *slt1* en *Schizosaccharomyces pombe*, tanto en el ciclo mitótico como en el meiótico. Además, existe también un proyecto para el aislamiento del homólogo funcional del *CDC15* de *Saccharomyces cerevisiae*, hasta ahora no descrito. Al estar implicada la anafase nuclear así como la citoquinesis, procesos conservados filogenéticamente en células eucariotas, habrían de existir en *Schizosaccharomyces pombe* genes similares a los presentes en *S. cerevisiae*.

Al contar con *CDC15* y con *slt1*, mediante la "técnica de dos híbridos" (Fields y Song, 1989) que permite detectar "in vivo" interacción entre proteínas, debería ser posible la identificación de proteínas funcionalmente relacionadas con *slt1*, en *Saccharomyces cerevisiae* y podría aclarar la función que esta proteína heteróloga está ejerciendo en el ciclo meiótico de esta levadura.

3.2.- *HLT1* HUMANO.

HLT1 fue aislado a partir de una genoteca de cDNA proveniente de la línea celular hepática humana HEPG2. Al igual que en el caso de *Schizosaccharomyces pombe*, el objeto con el que se transformó esta genoteca fue la búsqueda de supresores heterólogos del fenotipo *Lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

HLT1 fue aislado por su capacidad de complementar el defecto que en el ciclo meiótico presenta la estirpe diploide homocigótica *lyt1/lyt1*. Si bien, se pudo observar que también es capaz de complementar parcialmente el fenotipo *Cdc* que presenta en el ciclo mitótico, puesto que la lisis, tras ocho horas de incubación a temperatura restrictiva, es la mitad que la del mutante original, tal y como se muestra en la figura 32.

El inserto aislado es de 1000 pb y no presenta homología con genes anteriormente descritos, ni tan siquiera con *NPK16* *slt1*. La falta de similitud con otras familias de proteínas, nos hace dudar sobre la posible función de este gen; aunque se podría adelantar que debe actuar de manera similar a *NPK1* (ahora bien, teniendo en cuenta que no presenta estructura de proteína-quinasa) o bien sustituyendo funcionalmente al sustrato que *NPK1* fosforile en el ciclo meiótico.

HLT1 se comporta funcionalmente de manera similar a *slt1*, y se puede pensar que ambos están relacionados con la separación de los cromosomas tras su replicación, principalmente tras la primera división meiótica.

El hecho que el defecto de esporulación de la cepa *lyt1* de *S. cerevisiae* sea suprimido por dos genes heterólogos, indica que se podría tratar de una función conservada en la escala filogenética, que no debe ser específica de levaduras, sino tratarse más bien de una función general, probablemente relacionada con la separación de cromátidas hermanas en la replicación del DNA.

El defecto en el ciclo mitótico, que le confiere un fenotipo Cdc autolítico, se debe posiblemente a un fallo en la citoquinesis, posiblemente debida a una deficiencia en la consecución de la anafase nuclear. El modo de acción de *Cdc15p* está aún por definir, puesto que las diferentes hipótesis lanzadas por otros grupos trabajan en el mismo área del ciclo celular mitótico (Schweitzer y Philippsen, 1992, Amon *et al.*, 1993) están aún por demostrar. Sin embargo, en este trabajo, se ha demostrado, por primera vez, la implicación de *CDC15*, junto con *NPK1*, en el ciclo meiótico de *Saccharomyces cerevisiae*.

CONCLUSIONES

1.- La estirpe mutante *lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae* presenta dos características fenotípicas independientes:

- a.- Un fenotipo Cdc autolítico termosensible a 37°C.
- b.- Una incapacidad de esporular debido a la parada del ciclo meiótico tras la Meiosis I.

2.- El fenotipo Cdc es debido a una mutación en el marco abierto de lectura del gen *CDC15*.

Se clonó dicho gen a partir de una genotecagenómica de *Saccharomyces cerevisiae* y se caracterizó como responsable del defecto cdc de la cepa mutante *lyt1*. El rescate alélico de la copia de *CDC15* defectiva de la estirpe mutante *lyt1* muestra que la mutación se halla en el marco abierto de lectura y no en el promotor, a pesar que la transcripción de *CDC15* se encuentra disminuida en la cepa mutante *lyt1*.

3.- El defecto en esporulación es debido a una mutación en el gen *NPK1*. Este hecho se confirmó gracias a la clonación y caracterización de dicho gen a partir de una genoteca genómica de *Saccharomyces cerevisiae*, como supresor de la incapacidad de esporulación de la cepa diploide homocigótica *lyt1/lyt1*. El rescate alélico de la copia defectiva de *NPK1* de la estirpe mutante *lyt1*, muestra que la mutación se halla en el extremo 5' del marco abierto de lectura.

4.- Npk1p, proteína-quinasa hasta ahora de función desconocida, es imprescindible, en un fondo genético *cdc15*, para la consecución del ciclo meiótico y la esporulación en *Saccharomyces cerevisiae*.

5.- Se ha aislado el gen *slt1* de *Schizosaccharomyces pombe*, como supresor del defecto meiótico de la cepa mutante *lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Codifica una proteína de 433 aminoácidos, de función desconocida hasta ahora puesto que no presenta homologías significativas en bancos de datos internacionales.

6.- Se ha aislado el gen *HLT1* humano como supresor del defecto meiótico de la estirpe mutante *lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Su secuencia preliminar no ha revelado ninguna homología relevante en bancos de datos internacionales.

BIBLIOGRAFIA

Adams, A., R. M. Johnson, B. F. Longenecker, B. F. Sloat, y J. R. Pringle. 1990. *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and in the establishment of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111:131-142.

Amatruda, J. F., D. J. Gattermeir, T. S. Karpova, y J. A. Cooper. 1992. Effects of null mutations and overexpression of capping protein on morphogenesis, actin distribution and polarized secretion in yeast. *J. Cell Biol.* 119:1151-1162.

Amon, A., I. Irniger, y K. Nasmyth. 1994. Closing the cell cycle cycle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 77:1037-1050.

Amon, A., M. Tyers, B. Futcher, y K. Nasmyth. 1993. Mechanisms That Help the Yeast Cell Cycle Clock Tick: G2 Cyclins Transcriptionally activate G2 Cyclins and Repress G1 Cyclins. *Cell* 74:993-1007.

Andrews, B. J. y S. W. Mason. 1993. Gene Expression and the Cell Cycle: A Family Affair. *Science* 261:1543-1544.

Baroni, M., P. Monti, y L. Alberghina. 1994. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature* 371:339-342.

Barton, A.B., C.J. Davis, C.A. III Hutchison y D.B. Kaback. 1992. Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *FUN52* gene, whose product has homology to protein kinases. *Gene* 117:137-140.

Bender, A. y J. R. Pringle. 1989. Multicopy suppression of *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the RAS related gene *RSR1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9976-9980.

Bevan, E. A. y W. P. Costello. 1964. The preparation and use of an enzyme which breaks open yeast asci. *Microbiol. Genet. Bull.* 21:5.

Broach, J. R. 1991. Ras-regulated signaling processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 1:370-377.

Brockerhoff, S. E. y T. N Davis. 1992. Calmodulin concentrates at regions of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 118:619-629.

Buckingham, L. E., H. -T. Wang, R. T. Elder, R. M. McCarroll, M. L. Slater y R. E. Esposito. 1990. Nucleotide sequence and promoter analysis of *SPO13*, a meiosis specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9406-9410.

Byers, B. 1981. The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Cabib, E. y A. Duran. 1975. Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at non-permissive temperatures. *J. Bacteriol.* 124:1604-1606.

Camonis, J. H., M. Kalekine, B. Gondré, H. Garreau, E. Boy-Marcotte, y M. Jacquet. 1986. Characterization, cloning and sequence analysis of the *CDC25* gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 2:375-380.

Chant, J. 1994. Cell polarity in yeast. *TIG* 10, 9

Chant, J., K. Corrado, J. R. Pringle, y I. Herskowitz. 1991. Yeast *BUD5*, Encoding a Putative GDP-GTP Exchange Factor, Is Necessary for Bud Site Selection and Interacts with Bud Formation Gene *BEM1*. *Cell* 65:1213-1224.

Chant, J. y I. Herskowitz. 1991. Genetic Control of Bud Site Selection in Yeast by a Set of Gene Products That Constitute a Morphogenetic Pathway. *Cell* 65:1203-1212.

Chant, J. y J. R. Pringle. 1991. Budding and Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 1:342-350.

Cid, V. J., A. Duran, F. de Rey, C. Nombela, y M. Sanchez. 1995. The molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* (sometido a revisión).

Cid, V. J., M. Sanchez, y C. Nombela. 1994. Characterization of thermosensitive autolytic mutants from diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* 140:559-568.

Cross, F. R. 1988. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:4675-4684.

Cross, F. R. y A. H. Tinkelenberg. 1991. A Potential Positive Feedback Loop Controlling *CLN1* and *CLN2* gene Expression at the Start of the Yeast Cell Cycle. *Cell* 65:875-883.

Davis, L. G., M. D. Dibner, y J. F. Battey. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co., New York.

de la Fuente, J. M., A. Alvarez, C. Nombela, y M. Sanchez. 1992. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8:39-45.

Deshaies, R. J., V. Chau, y M. Kirschner. 1995. Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *EMBO J* 14, 2:303-312.

Dirick, L., T. Moll, H. Auer, y K. Nasmyth. 1992. A central role for *SWI6* in modulating cell cycle start-specific transcription in yeast. *Nature* 357:508-513.

Dirick, L. y K. Nasmyth. 1991. Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* 351:754-757.

Dohrmann, P. R., G. Butler, K. Tamai, S. Dorland, J. R. Greene, D. J. Thiele, y D. J. Stillman. 1992. Parallel Pathways of Gene Regulation: Homologous regulators *SWI5* and *ACE2* differentially control Transcription of *HO* and Chitinase. *Genes & Dev.* 6:93-104.

Dower, W. J., J. F. Miller, y C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-6145.

Drubin, D., K. Miller, y D. Botstein. 1988. Yeast actin binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* 107:1141-1154.

Epstein, C. B. y F. R. Cross. 1992. *CLB5*: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes & Dev.* 6:1695-1706.

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngbom, D. Distel, y T. Hunt. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389-396.

Feinberg, A. P. y B. Vogelstein. 1984. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum. Anal. Biochemistry.* 137:266-267.

Fields, S. y O. Song 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-246.

Finegold, A. A. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4448-4452.

Fink, G. R. 1971. Methods in enzymology. Vol. XVII. Academic Press, New York, London.

Fitch, I., C. Dahmann, U. Surana, A. Amon, K. Nasmyth, L. Goestch, B. Byers, y B. Futcher. 1992. Characterization of Four B-type Cyclin Genes of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 3:805-818.

Ford, S. K. y J. R. Pringle. 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell cycle: localization of the *CDC11* gene product and the timing of events at the budding site. *Dev. Genet.* 12:281-292.

Glutzer, M., A. W. Murray, y M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138.

Grandin, N. y S. I. Reed. 1993. Differential Function and Expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-Type Cyclins in Mitosis and Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4:2113-2125.

Jones D.G.L. y J. Rosamond. 1990. *Gene* 90:87-92.

Hadwiger, J. A, C. Wittenberg, M. Richardson, M. De Barros Lopes, y S. I. Reed. 1989. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6255-6259.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, p. 120-121. In D. M. Glover (ed.), DNA Cloning. IRL Press, Oxford, England.

Hartwell, L. H. 1970. Periodic Density Fluctuation During the Yeast Cell Cycle and the Selection of Synchronous Cultures. *J. Bacteriol.* 104, 3:1280-1285.

Hartwell, L. H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* Cell cycle. *Bacteriological Rev.* 38:164.

Hartwell, L. H. 1978. Cell division from a genetic perspective. *J. Cell Biol.* 77:627-637.

Hartwell, L. H. 1994. cAMPing out. *Nature* 371:286.

Herskowitz, I. 1988. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 4:536-553.

Holmes, D. S. y M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.

Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, y A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.

Johnson, D. I. y J. R. Pringle. 1990. Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of Cell polarity. *J. Cell Biol.* 111:143-152.

Johnston, L. H. 1992. Cell cycle control of gene expression in yeast. *Trends Cell Biol.* 2:353-357.

Johnston, M. y R. W. Davis. 1984. Sequences that regulate the divergent *GAL1- GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1440-1448.

Johnston, L. H., S.L. Eberly, J.W. Chapman, H. Araki, y A. Sugino. 1990. The product of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle Gene *DBF2* Has Homology with Protein Kinases and Is Periodically Expressed in the Cell Cycle. *M.C.B.* 10, 4:1358-1366.

Jonhston, J. R. y R. K. Mortimer. 1959. Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* 78:292.

Kilmartin, J. V. y A. E. M. Adams. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 98:922-933.

Kim, H. B., B. K. Haarer, y J. R. Pringle. 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell cycle: localization of the *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. *J. Cell Biol.* 112:535-544.

Koch, C., T. Moll, M. Neuberg, H. Ahorn, y K. Nasmyth. 1993. A Role for the Transcription Factors Mbp1 and Swi4 in Progression from G1 to S Phase. *Science* :1551-1557.

Koch, C. y K. Nasmyth. 1994. Cell cycle regulated transcripton in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 6:451-459.

Kühne, C. y P. Linder. 1993. A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the Cell cycle. *EMBO J* 12, 9:3437-3447.

Lagunas, R. y C. Gancedo. 1983. Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biol.* :479-483.

Lew, D. J. y S. I. Reed. 1992. A proliferation of cyclins. *Trends Cell Biol* 2:77-81.

Lillie, S. H. y S. S. Brown. 1994. *J. Cell Biol.* 125:825-842.

Lydall, D., G. Ammerer, y K. Nasmyth. 1991. A new role for MCM1 in yeast: Cell Cycle regulation of *SWI5* transcription. *Genes & Dev.* 5:2405-2419.

Lörincz, A. y S. I. Reed. 1984. Primary structure homology between the product of the yeast division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* 307:183-185.

Madden, K., C. Costigan, y M. Snyder. 1992. Cell polarity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol* 2:22-29.

Malavasic, M. J. y R. T. Elder. 1990. Complementary transcripts from two genes necessary for normal meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2809-2819.

Malone, R. E. 1990. Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* 61:375-378.

Miller, J. J. 1989. Sporulation on *Saccharomyces cerevisiae*, p. 489-550. In A. H. Rose and J. S. Harrison (ed.), *The Yeasts*. Academic Press, Ltd., London.

Molero, G. 1992. Caracterización de un gen específico de esporulación capaz de complementar una mutación que determina fenotipo autolítico en ciclo mitótico de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral - U. C. M. -

Molero, G., M. Yuste-Rojas, A. Montesi, A. Vazquez, C. Nombela, y M. Sánchez. 1993. A *cdc*-Like Autolytic *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Altered in Budding Site Selection Is Complemented by *SPO12*, a Sporulation Gene. *J. Bacteriol.* 172,20:6562-6570.

Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch, y K. Nasmyth. 1991. The role of phosphorylation and the *CDC28* protein kinase in Cell cycle-regulated nuclear import of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor Swi5. *Cell* 66:743-758.

Munder, T., M. Mink, y H. Küntzel. 1988. Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* *CDC25* gene controlling mitosis and meiosis. *Mol. Gen. Genet* 214:271-277.

Murray, A. W. y T. Hunt. 1993. The Cell cycle: an introduction. Oxford University Press, New York.

Nash, R., G. Tokiwa, S. Anand, K. Erickson, y B. Futcher. 1988. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers Cell division to Cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J* 7:4335-4346.

Nasmyth, K. 1993. Regulating the HD endonuclease in yeast. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3:286-294.

Nasmyth, K. y L. Dirick. 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 66:995-1013.

Nasmyth, K. y T. Hunt. 1993. Dams and sluices. *Nature* 366:634-635.

Nombela, C. y C. Santamaría. 1984. Genetics of yeast Cell wall autolysis, p. 249-260. In C. Nombela (ed.), Microbial Cell wall synthesis and autolysis. Elsevier Science, Amsterdam.

Ogas, J., B. J. Andrews, y I. Herskowitz. 1991. Transcriptional activation of CLN1, CLN2 and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 66:1015-1026.

Ogur et al. 1957. *Science* 125:928.

Park, H-O., J. Chant, y I. Herskowitz. 1993. BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature* 365:269-274.

Parkes, V. y L.H. Johnston. 1992. SPO12 and SIT4 suppress mutations in DBF2, which encodes a cell cycle protein kinase that is periodically expressed. *Nucleic. Ac. Research.* 20, 21:5617-5623.

Quinlan, R. A., C. I. Pogson, y K. Gull. 1980. The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the Cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 46:341-352.

Reed, S. I. 1991. *TIG* 7:95-99.

Reed, S. I. 1992. The role of p34 Kinases on the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:529-561.

Ron, D. 1993. *New Biol.* 372:379.

Santamaría, C. 1985. "Aislamiento y caracterización de mutantes de *S. cerevisiae* alterados en los mecanismos de autólisis de la pared celular". Tesis Doctoral. Univ. Complutense, Madrid.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schweitzer, B. y P. Philippsen. 1991. *CDC15*, An Essential Cell Cycle Gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Encodes a Protein Kinase Domain. *Yeast* 7:265-273.

Schweitzer, B. y P. Philippsen. 1992. *NPK1*, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans* nimA. *Mol. Gen. Genet* 234:164-167.

Schwob, E. y K. Nasmyth. 1993. *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev.* 7:1160-1175.

Sherman, F., G. R. Fink, y B. Hicks. 1983. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Slater, M. L. 1973. Effect of reversible inhibition of deoxiribonucleic acid synthesis on the yeast Cell cycle. *J. Bacteriol.* 113:263-270.

Snyder, M., S. Gehrung, y B. D. Page. 1991. Studies Concerning the Temporal and Genetic Control of Cell Polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 114, 3:515-532.

Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer, y R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomus replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 76:1035-1039.

Surana, U., A. Amon, C. Dowzer, J. McGrew, B. Byers, y K. Nasmyth. 1993. Destruction of the *CDC28/CLB* mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J* 12, 5:1969-1978.

Tebb, G., T. Moll, C. Dowzer, y K. Nasmyth. 1993. *SWI5* instability may be necessary but is not sufficient for asymmetric *HO* expression in yeast. *Genes & Dev.* 7:517-528.

Timson, J. 1975. *Mutation Research* 32:115.

Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, y M. Wigler. 1987. Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the AMPc-dependent proteim kinase. *Cell* 50:277-287.

Tokiwa, G., M. Tyers, T. Volpe, y B. Futcher. 1994. Inhibitor of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature* 371:342-345.

Torres, L., H. Martín, M.I. García-Saez, J. Arroyo, M. Molina, M. Sánchez and C. Nombela. 1991. A protein Kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.* 5:2845-2954.

Toyn, J.H. y L.H. Jonhston. 1993. *Spo12* Is a Limiting Factor That Interacts With the Cell Cycle Protein Kinases *Dbf2* and *Dbf20*, Wich Are Involved in Mitotic Chromatid Disjunction. *Genetics* 135:963-971.

Toyn, J.H. y L.H. Johnston. 1994. The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition. *EMBO J.* 13, 5:1103-1113.

Treisman, R. y G. Ammerer. 1992. The SRF and MCM1 transcription factors. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 2:221-226.

Tyers, M., G. Tokiwa, y B. Futcher. 1993. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12, 5:1955-1968.

Wheals, A. E. 1987. The Yeasts. Academic press, Inc., London.

Wittenberg, C. y S. I. Reed. 1988. Control of the yeast Cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* 54:1061-1072.

Yaglom, J., M. H. K. Linskens, S. Sadis, D. M. Rubin, B. Futcher, y D. Finley. 1995. p34Cdc28-Mediated Control of Cln3 Cyclin Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2:731-741.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:109-119.

Zheng, Y., R. Cerione, y A. Bender. 1993. Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. *J. Biol. Chem* 269:2369-2372.

Ziman, M. 1991. *Mol. Cell. Biol.* 11:3537-3544.

Ziman, M. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 4:1207-1316.